



**Ana Carolina Cardoso Marques**

Licenciada em Química Aplicada – Ramo de Biotecnologia

**Desenvolvimento de um sensor  
colorimétrico em papel para a deteção  
de bactérias eletroquimicamente ativas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT - UNL  
Coorientador: Carlos Alberto Gomes Salgueiro, Prof. Doutor, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares  
Arguente: Prof. Doutor Hugo Manuel Brito Águas  
Vogais: Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato  
Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Outubro de 2014**



**Ana Carolina Cardoso Marques**

Licenciada em Química Aplicada – Ramo de Biotecnologia

**Desenvolvimento de um sensor colorimétrico em papel  
para a deteção de bactérias eletroquimicamente ativas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT - UNL

Coorientador: Carlos Alberto Gomes Salgueiro, Prof. Doutor, FCT-UNL

**Outubro de 2014**



# **DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR COLORIMÉTRICO EM PAPEL PARA A DETEÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROQUIMICAMENTE ATIVAS**

© Ana Carolina Cardoso Marques

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*“- C’est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante.”*

*Antoine de Saint-Exupéry, em Le Petit Prince (1943)*





## AGRADECIMENTOS

É com um enorme sentimento de realização pessoal e profissional que termino mais uma etapa da minha formação académica. Este feito teria sido impossível sem a ajuda de muitas pessoas a quem deixo o meu mais sincero agradecimento.

À minha orientadora, Professora Elvira Fortunato por me ter proporcionado a integração num centro de investigação de excelência, pela orientação e por me ter inculcido o espírito de querer sempre mais.

Ao meu coorientador, Professor Carlos Salgueiro pela orientação, paciência, conhecimentos transmitidos e capacidade de estímulo ao longo de todo o trabalho.

À Lídia Santos por tanta coisa que é quase impossível enumerar. Obrigada por todo o apoio que se revelou sempre decisivo.

À Mafalda Costa por toda ajuda em várias etapas deste trabalho, pela paciência e tempo despendido e pelos serões de escrita.

À Joana Dantas pela disponibilidade, paciência e ajuda ao longo de todo este processo. Aos restantes membros do Grupo *Biochemistry and Bioenergetics of Heme Proteins* pelo bom-ambiente vivido sempre no laboratório.

Ao Paulo Duarte pela ajuda sempre disponível e por me ter ensinado aquelas pequenas coisas que fizeram toda a diferença.

À Alexandra Gonçalves pela paciência em responder a todos os meus imensos pedidos no laboratório. À Sónia Pereira também pelo apoio no laboratório e pelo cuidado com as minhas amostras para análise. À Joana Pinto pela ajuda na minha iniciação na técnica de análise de Difração de raios-X. À Daniela Gomes pela ajuda e paciência na visualização das minhas amostras no Microscópio eletrónico de varrimento. Aos restantes colegas do CENIMAT, que embora não estejam mencionados, fomentaram sempre a boa disposição e cooperação no laboratório.

Aos meus companheiros de laboratório Filipa, Inês e João por todos os momentos de descontração, de companheirismo e de entreajuda.

À Diana e ao Mauro porque sim. Não é, nem nunca será preciso dizer mais nada.

Ao Sérgio por todo o apoio, amor, carinho e paciência ao longo deste ano. Sem ti teria sido muito difícil.

Aos meus pais pelas ferramentas que me deram ao longo da vida que me permitiram terminar com sucesso esta etapa, pelo apoio incondicional e por, embora com um grande esforço, sempre me terem permitido seguir em frente no meu percurso académico. Também ao meu irmão que, como irmão mais velho, contribui para a minha educação. Valeu a pena. Obrigada.



## RESUMO

Bactérias eletroquimicamente ativas possuem a capacidade de transferir elétrons extracelularmente, durante a respiração celular. Esta característica tem sido atualmente explorada para aplicação na produção de eletricidade, tratamento de águas residuais, biorremediação e em diversas áreas da biotecnologia, onde a transferência eletrônica ocorre na presença de aceitadores insolúveis (tais como, óxidos metálicos e ânodos metálicos). Contudo, o número de espécies identificadas, isoladas e caracterizadas até à data é bastante reduzido. Os métodos atualmente disponíveis para deteção de bactérias eletroquimicamente ativas são morosos, dispendiosos e complexos de operar, tornando-se necessário o desenvolvimento de outros métodos mais rápidos, simples e menos dispendiosos que auxiliem na otimização das aplicações mencionadas. O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de um sensor colorimétrico de papel utilizando um material eletrocromico, trióxido de tungsténio, como camada ativa para a deteção destas bactérias. Para isso, foram definidos no papel poços delimitados por barreiras hidrofóbicas, através da impressão e difusão de uma camada de cera. As várias amostras de nanopartículas de  $\text{WO}_3$ , sintetizadas por um método hidrotermal assistido por micro-ondas, foram depositadas nos poços por *drop casting*. As nanopartículas com estrutura cristalográfica hexagonal, impregnadas no sensor de papel, foram capazes de detetar com sucesso uma bactéria eletroquimicamente ativa, *Geobacter sulfurreducens*, desde uma fase de crescimento bastante inicial ( $\text{Abs}_{600 \text{ nm}} = 0,1$ , correspondente a 0,07 g/L com um rácio RGB de  $1,10 \pm 0,040$ ) até à fase exponencial-tardia ( $\text{Abs}_{600 \text{ nm}} = 0,5$ , correspondente a 0,33 g/L com um rácio RGB de  $1,33 \pm 0,005$ ), com  $P < 0,0001$ . O sensor de papel e respetivo método de deteção colorimétrico desenvolvido neste trabalho, revelou ser sensível e específico à deteção destas bactérias, de uma forma rápida, simples e pouco dispendiosa.

**Palavras-chave:** bactérias eletroquimicamente ativas, síntese hidrotermal, nanopartículas de trióxido de tungsténio, materiais electrocromicos, sensores de papel, deteção colorimétrica.



## ABSTRACT

Electrochemically active bacteria have the ability to transfer electrons to cell exterior towards insoluble electron acceptors. This characteristic has been currently explored to be used in electricity production, wastewater treatment, bioremediation and other applications in biotechnology fields, where electronic transfer occurs in the presence of insoluble acceptors (such as, metal oxides and metal anodes). However, the number of identified, isolated and characterized species is still very limited. The detection methods currently existing are slow, expensive and complex, thus the development of a rapid, inexpensive and simple detection method is critical for the optimization of the applications mentioned above. The main goal of this work was the development of a paper-based colorimetric sensor that uses an electrochromic material, tungsten trioxide, as the active layer for the detection of EAB. Thereunto, the design of the sensor was defined by printing and diffusing of a wax layer that generated the solution wells delimited by hydrophobic barriers onto the paper. The  $\text{WO}_3$  nanoparticles, synthesized through a microwave assisted hydrothermal method, were deposited in the wells by drop casting. The nanoparticles with hexagonal crystallographic structure were able to successfully detect an electrochemically active bacteria, *Geobacter sulfurreducens*, from an early growth stage ( $\text{Abs}_{600\text{ nm}} = 0.1$ , corresponding to 0.07 g/L with a RGB ratio of  $1.10 \pm 0.040$ ) to a late-exponential growth stage ( $\text{Abs}_{600\text{ nm}} = 0.5$ , corresponding to 0.33 g/L with a RGB ratio of  $1.33 \pm 0.005$ ), with  $P < 0.0001$ . The developed paper-based sensor and colorimetric detection method developed in this work, revealed its sensibility and specificity to detection of these bacteria, in a rapid, simple and inexpensive way.

**Keywords:** electrochemically active bacteria, hydrothermal synthesis, tungsten trioxide nanoparticles, electrochromic materials, paper-based sensors, colorimetric detection.



## LISTA DE ACRÓNIMOS

**NAD** – Nicotinadamida Adenina Nucleótido

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**TEE** – Transferência Eletrônica Extracelular

**MFC** – Célula de Combustível Microbiana (do inglês, *Microbial Fuel Cell*)

**EAB** – Bactéria Eletroquimicamente Ativa (do inglês, *Electrochemically Active Bacteria*)

**CBO** – Carência Bioquímica de Oxigênio

**MEC** – Célula de Eletrólise Microbiana (do inglês, *Microbial Electrolysis Cell*)

**ADN** – Ácido Desoxirribonucleico

**a.C.** – Antes de Cristo

**d.C.** – Depois de Cristo

**OBA** – Branqueador Ótico (do inglês, *Optical Brightener*)

**ASA** – Anidrido Alquenil Succínico (do inglês, *Alkyl Succinic Anhydride*)

**AKD** – Dímero de Alquil Ceteno (do inglês, *Alkyl Ketene Dimer*)

**Redox** – Oxidação-Redução

**MEC** – Material Eletrocromático

**CENIMAT** – Centro de Investigação em Materiais

**NPs** – Nanopartículas

**PTA** – Ácido Peroxotúngstico

***G. sulfurreducens/Gs*** – *Geobacter sulfurreducens*

***E. coli*** – *Escherichia coli*

**LB** – *Luria-Broth*

**Abs** – Absorvância

**HDMS** – Hexametildissilazano (do inglês, *Hexamethyldisilazane*)

**XRD** – Difração de raios-X (do inglês *X-rays Diffraction*)

**SEM** – Microscopia Eletrônica de Varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*)

**EDS** – Espectroscopia Dispersiva de raios-X (do inglês, *Energy Dispersive Spectroscopy*)

**FTIR** – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared*)

**ATR** – Refletância Total Atenuada (do inglês, *Attenuated Total Reflectance*)

**TG** – Termogravimetria

**DSC** – Varrimento Diferencial de Calorimetria (do inglês, *Diferencial Scanning Calorimetry*)

**DLS** – Difusão Dinâmica da Luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering*)

**UV-Vis** – Ultravioleta-visível

**ADE** – Agente Direcional de Estrutura

***m*-WO<sub>3</sub>** – WO<sub>3</sub> monoclinico

***o*-WO<sub>3</sub>** – WO<sub>3</sub> ortorrômbico

***h*-WO<sub>3</sub>** – WO<sub>3</sub> hexagonal

**ICDD** – Centro Internacional de Dados de Difração (do inglês, *International Centre for Diffraction Data*)

**u. a.** – Unidade Adimensional

**RGB** – do inglês, *Red Green Blue*



## LISTA DE SÍMBOLOS

**NaCl** – Cloreto de sódio  
**WO<sub>3</sub>** – Trióxido de tungstênio  
**CaTiO<sub>3</sub>** – Titanato de cálcio  
**H<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·nH<sub>2</sub>O** – Ácido túngstico hidratado  
**Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O** – Tungstato de sódio dihidratado  
**HCl** – Ácido clorídrico  
**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Sulfato de sódio  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio  
**MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O** – Sulfato de magnésio heptahidratado  
**NaHCO<sub>3</sub>** – Bicarbonato de sódio  
**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O** – Carbonato de sódio hidratado  
**Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>** – Selenato de sódio  
**NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O** – Acetato de sódio trihidratado  
**Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>** – Fumarato de sódio  
**CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O** – Cloreto de cálcio dihidratado  
**N<sub>2</sub>** – Azoto  
**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono  
**O<sub>2</sub>** – Oxigênio molecular  
**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O** – Fosfato de sódio dihidratado  
**KCl** – Cloreto de potássio  
**CH<sub>3</sub>COONa** – Acetato de sódio  
**CaCO<sub>3</sub>** – Carbonato de cálcio  
**°C** – Graus celsius  
**keV** – Kilo-eletrão volt  
**d** – Diâmetro  
**cm** – Centímetro  
**mm** – Milímetro  
**μm** – Micrómetro  
**nm** – Nanómetro  
**L** – Litro  
**mL** – Mililitro  
**μL** – Microlitro  
**M** – Molar  
**mM** – Milimolar  
**g** – Grama  
**rpm** – Rotações por minuto  
**Å** – Ångström  
**°** – Ângulo



## ÍNDICE DE MATÉRIAS

AGRADECIMENTOS .....	III
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VII
LISTA DE ACRÓNIMOS .....	IX
LISTA DE SÍMBOLOS .....	XI
ÍNDICE DE MATÉRIAS .....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XVII
ÍNDICE DE TABELAS .....	XXI
1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS .....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	3
2.1. Micro-Organismos Redutores de Óxidos Metálicos .....	3
2.2. Bactérias Eletroquimicamente Ativas .....	4
2.2.1. Aplicações .....	4
2.2.2. Mecanismos de Transferência Eletrónica Extracelular .....	7
2.2.3. A Bactéria <i>Geobacter sulfurreducens</i> : Fisiologia, Ecologia e Aplicações .....	8
2.3. Métodos de Detecção: Estado da Arte .....	8
2.4. Papel .....	9
2.4.1. Fabrico do Papel .....	10
2.5. Métodos de Detecção Colorimétrica .....	12
2.6. Eletrocromismo .....	13
2.6.1. Materiais Eletrocrómicos .....	13
2.6.2. Trióxido de Tungsténio: Propriedades, Aplicações E Estrutura Cristalina E Energética .....	14
2.6.3. Óxidos de Metais de Transição à Escala Nano .....	15
3. DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL .....	17
3.1. Síntese das Nanopartículas de WO <sub>3</sub> .....	17
3.2. Construção dos Sensores de Papel .....	18
3.3. Crescimento bacteriano .....	21

3.3.1. Crescimento da Bactéria <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	21
3.3.2. Caracterização da Bactéria <i>Geobacter sulfurreducens</i> : Curva de Crescimento e Determinação do Peso Seco .....	22
3.3.3. Crescimento da Bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	23
3.4. Ensaio Colorimétrico .....	23
3.4.1. Testes em Solução.....	24
3.4.2. Testes em Papel .....	24
3.5. Protocolo para a Preparação de Amostras Biológicas para Microscopia Eletrónica de Varrimento.....	25
4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO .....	27
4.1. Caracterização Estrutural e Morfológica .....	27
4.1.1. Difração de raios-X .....	27
4.1.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento .....	28
4.1.3. Espectroscopia Dispersiva de raios-X.....	29
4.2. Caracterização Química .....	30
4.2.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do Modo ATR.....	30
4.3. Difusão Dinâmica da Luz.....	31
4.4. Ângulo de Contacto .....	32
4.5. Análise Térmica.....	33
4.5.1. Termogravimetria.....	34
4.5.2. Calorimetria Diferencial de Varrimento .....	34
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	35
5.1. Caracterização das Nanopartículas de WO <sub>3</sub> Sintetizadas .....	35
5.1.1. Difração de raios-X .....	36
5.1.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier .....	40
5.1.3. Microscopia Eletrónica de Varrimento .....	41
5.2. Caracterização dos Substratos de Papel .....	43
5.2.1. Difração de raios-X .....	44
5.2.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier .....	45
5.2.3. Microscopia Eletrónica de Varrimento .....	46
5.2.4. Espectroscopia Dispersiva de raios-X.....	47

5.2.5. Análise Térmica.....	49
5.3. Desenvolvimento do Sensor de Papel.....	50
5.3.1. Formação das Barreiras Hidrofóbicas.....	50
5.3.2. Impregnação dos Poços com as WO <sub>3</sub> NPs.....	52
5.4. A Bactéria <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	52
5.5. Ensaio Colorimétrico .....	54
6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
ANEXOS.....	71
A – Fichas cristalográficas das estruturas cristalográficas monoclinica, ortorrômbica hidratada e hexagonal .....	
	71
B – Rácios RGB calculados para os controlos negativos.....	82
C – Ensaio colorimétrico em diferentes substratos de papel .....	83
D – Análise ANOVA.....	84
E – Protótipo do sensor colorimétrico de papel desenvolvido.....	86



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Transferência eletrônica dos micro-organismos redutores de óxidos metálicos. (A) Transferência eletrônica para aceptadores solúveis; (B) Transferência eletrônica para aceptadores insolúveis.....	3
Figura 2.2 Esquema ilustrativo de uma célula de combustível microbiana. ....	5
Figura 2.3 Tipos de transferência eletrônica entre as bactérias eletroquimicamente ativas e os aceptadores eletrônicos insolúveis (filme a roxo): (A) Transferência eletrônica direta; (B) Transferência eletrônica por mediadores eletroquímicos; (C) Transferência eletrônica por formação de biofilmes. ....	7
Figura 2.4 Imagem da bactéria <i>Geobacter sulfurreducens</i> obtida por microscopia eletrônica de varrimento. ....	8
Figura 2.5 Métodos de detecção de bactérias eletroquimicamente ativas baseados nos princípios das MFCs. (A) método de rastreamento baseado na medição da tensão; (B) múltiplas MFCs microfabricadas; (C) MFC em forma de U. ....	9
Figura 2.6 Constituição da parede celular vegetal. Origem das fibras de celulose. ....	11
Figura 2.7 Algumas das aplicações dos materiais eletrocromáticos desenvolvidas no CENIMAT. ....	13
Figura 2.8 (A) Célula unitária da estrutura de perovskite. O átomo C representa a lacuna da estrutura com defeito; (B) Representação esquemática da estrutura das bandas do $\text{WO}_3$ , correspondente à simetria de perovskite com defeito.....	15
Figura 3.1 Micro-ondas utilizado na síntese das $\text{WO}_3$ NPs.....	18
Figura 3.2 Protótipo do sensor de papel. (A) Parte frontal de um dos protótipos utilizados nos ensaios colorimétricos; (B) Esquema por camadas do sensor de papel produzido. ....	19
Figura 3.3 Representação esquemática da impressora utilizada na produção dos sensores de papel. Ampliação que mostra a tecnologia de derretimento da tinta sólida e passagem para o papel. ..	19
Figura 3.4 Esquema ilustrativo do que acontece antes e depois da difusão da cera e depois do encapsulamento. ....	20
Figura 3.5 Impregnação por <i>drop casting</i> dos poços com as nanopartículas de $\text{WO}_3$ .....	20
Figura 3.6 Aparato utilizado para o desarejamento do meio NBAF. ....	21
Figura 3.7 Câmara anaeróbia usada nos ensaios colorimétricos deste trabalho. ....	24
Figura 4.1 Interferência construtiva dos -X com o material cristalino. ....	27
Figura 4.2 Equipamento utilizado na Difração de raios-X.....	28
Figura 4.3 (A) Equipamento utilizado na Microscopia eletrônica de varrimento; (B) Representação esquemática de um equipamento de SEM. ....	29
Figura 4.4 (A) Equipamento utilizado na Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; (B) Tipos de deformações. ....	31
Figura 4.5 (A) Aparelho utilizado na técnica de Difusão dinâmica da luz; (B) Representação esquemática da medição da intensidade da luz dispersa ao longo do tempo. ....	31
Figura 4.6 Esquema ilustrativo do comportamento de uma gota de líquido numa superfície. ....	32

Figura 4.7 Equipamento utilizado na medição dos ângulos de contacto dos substratos de papel. ....	33
Figura 4.8 Aparelho utilizado na análise térmica dos substratos de papel. ....	33
Figura 5.1 Difractogramas das WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas. (A) WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas a partir das soluções com Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, NaCl; (B) WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas a partir das soluções com Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; (C) WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas a partir das soluções com PTA. ....	36
Figura 5.2 Imagens das estruturas cristalográficas obtidas na síntese das WO <sub>3</sub> NPs. (A) Estrutura cristalográfica monoclinica; (B) Estrutura cristalográfica ortorrômbica com os dois tipos de ligação – tipo I e tipo II; (C) Estrutura cristalográfica hexagonal onde são evidenciados os túneis hexagonais e as cavidades trigonais. ....	38
Figura 5.3 Espectros de FTIR das WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas. (A) WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas a partir das soluções com Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, NaCl; (B) WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas a partir das soluções com Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; (C) WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas a partir das soluções com PTA. ....	40
Figura 5.4 Imagens de SEM das amostras de WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas. ....	41
Figura 5.5 Papéis utilizados no desenvolvimento do sensor de papel. (A) Papel de fotocópia 300 % da Soporcel; (B) Papel Whatman. ....	43
Figura 5.6 Difractogramas do papel de fotocópia e do papel Whatman. ....	44
Figura 5.7 Análise química dos substratos de papel. (A) Espectros de FTIR do papel de fotocópia e do papel Whatman; (B) Ampliação da região de impressão digital do espectro de FTIR do papel de fotocópia; (C) Estrutura química do polímero celulose. ....	45
Figura 5.8 Morfologia dos substratos de papel utilizados. (A) Imagem SEM do papel de fotocópia; (B) Imagem SEM do papel Whatman. ....	46
Figura 5.9 Análise EDS do papel de fotocópia. (A) Imagem SEM à qual a análise foi feita; (B) Espectro cumulativo da análise EDS ao papel de fotocópia. ....	47
Figura 5.10 Mapa EDS do papel de fotocópia. ....	48
Figura 5.11 Análise térmica dos substratos de papel. (A) Curva TG e DSC do papel de fotocópia; (B) Curva TG e DSC do papel Whatman. ....	49
Figura 5.12 Ângulos de contacto formados entre uma gota de água e o papel de fotocópia (A) e o papel de fotocópia com cera difundida (B). ....	50
Figura 5.13 Formação das barreiras hidrofóbicas no papel de fotocópia. ....	51
Figura 5.14 Imagens SEM das superfícies dos substratos de papel funcionalizados com as WO <sub>3</sub> NPs. (A) Papel de fotocópia funcionalizado com WO <sub>3</sub> NPs; (B) Papel Whatman funcionalizado com as WO <sub>3</sub> NPs. ....	52
Figura 5.15 Imagem SEM da bactéria <i>Geobacter sulfurreducens</i> . ....	53
Figura 5.16 (A) Curva de crescimento e (B) Peso seco em função da absorvância a 600 nm da bactéria <i>G. sulfurreducens</i> . ....	53
Figura 5.17 Ensaio colorimétrico em solução das WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas (5 g/L) com a bactéria <i>G. sulfurreducens</i> na fase exponencial-tardia (Abs 600 nm = 0,5, correspondente a 0,33 g/L. Os resultados foram registados após 30 minutos. (A) Fotografia da microplaca de 96-poços com a linha de teste (Gs), os controlos negativos ( <i>E. coli</i> e tampão) e o branco; (B) Gráfico de barras resultante da análise RGB com o software <i>ImageJ</i> . ....	55



Figura 5.18 Ensaio colorimétrico em papel das WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas (5 g/L) com a bactéria <i>G. sulfurreducens</i> na fase exponencial-tardia (Abs 600 nm = 0,5, correspondente a 0,33 g/L. Os resultados foram registados após 4 horas. (A) Fotografia do sensor de papel de fotocópia com a linha de teste (Gs), os controlos negativos ( <i>E. coli</i> e tampão) e o branco; (B) Gráfico de barras resultante da análise RGB com o <i>software ImageJ</i> ; (C) Fotografia do sensor de papel Whatman com a linha de teste (Gs), os controlos negativos ( <i>E. coli</i> e tampão) e o branco; (D) Gráfico de barras resultante da análise RGB com o <i>software ImageJ</i> .....	57
Figura 5.19 Ensaio colorimétrico de otimização no sensor de papel de fotocópia com poços 7,00 x 7,00 mm, com registo de resultados após 4 horas. (A) Fotografia do sensor de papel. Variação da concentração das nanopartículas de <i>h</i> -WO <sub>3</sub> de 5 a 30 g/L (linhas A - F), variação da concentração de <i>G. sulfurreducens</i> de 0,07 a 0,33 g/L (linhas 1 – 5), controlo negativo (linha 6) e branco (linha 7); (B) Análise RGB dos resultados obtidos com as várias concentrações de <i>h</i> -WO <sub>3</sub> NPs e <i>G. sulfurreducens</i> . ....	58
Figura 5.20 Imagens ampliadas da superfície do papel de fotocópia funcionalizados com as WO <sub>3</sub> NPs de geometria hexagonal.....	59
Figura 5.21 Análise RGB das condições otimizadas para a deteção de EAB, no sensor de papel de fotocópia com dimensões dos poços a mimetizar microplacas de 96 poços. ....	59
Figura 5.22 Ensaio colorimétrico de otimização no sensor de papel Whatman, com registo de resultados após 4 horas. ....	60
Figura 5.23 Ensaio colorimétrico de otimização no sensor de papel de fotocópia com poços 3,84 x 3,84 mm, com registo de resultados após 2 horas. (A) Fotografia do sensor de papel. Variação da concentração das nanopartículas de <i>h</i> -WO <sub>3</sub> de 5 a 30 g/L (linhas A – F), variação da concentração de <i>G. sulfurreducens</i> de 0,07 a 0,33 g/L (linhas 1 – 5), controlo negativo (linha 6) e branco (linha 7); (B) Análise RGB dos resultados obtidos com as várias concentrações de <i>h</i> -WO <sub>3</sub> NPs e <i>G. sulfurreducens</i> . ....	60
Figura 5.24 Representação gráfica da variação do rácio RGB com a concentração de bactéria no sensor de papel com dispersão de <i>h</i> -WO <sub>3</sub> NPs a 15 g/L e a 20 g/L .....	61
Figura 5.25 Análise RGB das condições otimizadas para a deteção de EAB, no sensor de papel de fotocópia com dimensões dos poços a mimetizar microplacas de 96 poços. ....	62
Figura 5.26 Sensor colorimétrico final otimizado para a deteção de bactérias eletroquimicamente ativas. ....	63
Figura 0.1 Resultados colorimétricos em vários tipos de papel de cromatografia.....	83
Figura 0.2 Resultados colorimétricos na frente e verso de papel coreano.....	84
Figura 0.3 Resultados colorimétricos em papel de celulose bacteriana. ....	84



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 Características principais da bactéria <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	8
Tabela 2.2 Constituintes principais da parede celular vegetal da madeira.....	11
Tabela 2.3 Constituição de uma folha de papel. Discriminação dos aditivos utilizados e respetiva função.....	12
Tabela 3.1 Reagentes e quantidades utilizadas nas soluções iniciais para a síntese das WO <sub>3</sub> NPs. .	17
Tabela 5.1 Nomenclatura das WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas.....	35
Tabela 5.2 Parâmetros de célula das nove amostras de WO <sub>3</sub> NPs.....	38
Tabela 5.3 Determinação do tamanho das WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas.....	42
Tabela 5.4 Propriedades macroscópicas do papel de fotocópia e do papel Whatman.....	43
Tabela 5.5 Nomenclatura das WO <sub>3</sub> NPs sintetizadas.....	54
Tabela 5.6 Análise de custos do sensor de papel desenvolvido. ....	63
Tabela 0.1 Rácios RGB calculados para os controlos negativos do ensaio colorimétrico em solução. ....	82
Tabela 0.2 Rácios RGB calculados para os controlos negativos do ensaio colorimétrico em papel de fotocópia.....	82
Tabela 0.3 Rácios RGB calculados para os controlos negativos do ensaio colorimétrico em papel Whatman. ....	82
Tabela 0.4 Rácios RGB calculados para os controlos negativos do ensaio colorimétrico de optimização em papel de fotocópia com poços 7 x 7 mm. ....	83
Tabela 0.5 Rácios RGB calculados para os controlos negativos do ensaio colorimétrico de optimização em papel de fotocópia com poços 3,84 x 3,84 mm. ....	83
Tabela 0.6 – Teste de múltipla comparação de <i>Tukey</i> para as <i>h</i> -WO <sub>3</sub> NPs 10 g/L. ....	84
Tabela 0.7 – Teste de múltipla comparação de <i>Tukey</i> para as <i>h</i> -WO <sub>3</sub> NPs 15 g/L. ....	85



# 1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

Atualmente, a crise energética associada à dependência do petróleo tem estimulado a comunidade científica a explorar e diversificar fontes de energia renováveis. A descoberta de bactérias eletroquimicamente ativas que possuem a capacidade de transferir os eletrões produzidos durante o seu crescimento para o exterior das suas células, tem despertado o interesse nas últimas décadas, uma vez que esta capacidade está associada a diversas aplicações que vão desde a biorremediação à produção de eletricidade.

A quantidade de bactérias eletroquimicamente ativas identificadas e isoladas do meio-ambiente é ainda muito reduzida quando comparada com a sua abundância na natureza, o que torna a sua utilização e otimização restrita e com possibilidades de ser amplamente alargada. Este problema deve-se essencialmente ao facto de os métodos de deteção desenvolvidos até à data serem morosos, complexos e usarem equipamentos e materiais desadequados ou difíceis de manipular. Assim o desenvolvimento de um método de deteção rápido e simples é fulcral no processo de isolamento destes organismos e na obtenção de novos conhecimentos sobre a sua fisiologia e ecologia.

O papel tem emergido nos últimos anos como um material adequado para ser usado como suporte em testes biológicos e químicos oferecendo várias vantagens como, por exemplo, baixo custo, fácil manuseamento, descartabilidade e biocompatibilidade.

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver um sensor colorimétrico de papel, de baixo custo e fácil utilização, de forma a detetar a presença de bactérias eletroquimicamente ativas. Para tal, foi utilizado um material eletrocrómico, trióxido de tungsténio, para a visualização rápida de uma resposta positiva ou negativa.

As etapas principais deste trabalho englobaram:

- (i) Síntese de nanopartículas de trióxido de tungsténio: otimização e estudo da síntese hidrotermal assistida por micro-ondas através da variação de três parâmetros: precursor, agente direcional de estrutura e pH da solução;
- (ii) Fabricação e otimização do sensor de papel: escolha do suporte de papel, desenho do sensor e adequação das soluções/dimensões para uma correta visualização da resposta eletrocrómica;
- (iii) Prova de conceito com uma bactéria eletroquimicamente ativa, *Geobacter sulfurreducens*: tratamento e caracterização da bactéria e análise dos resultados dos sensores de papel desenvolvidos.

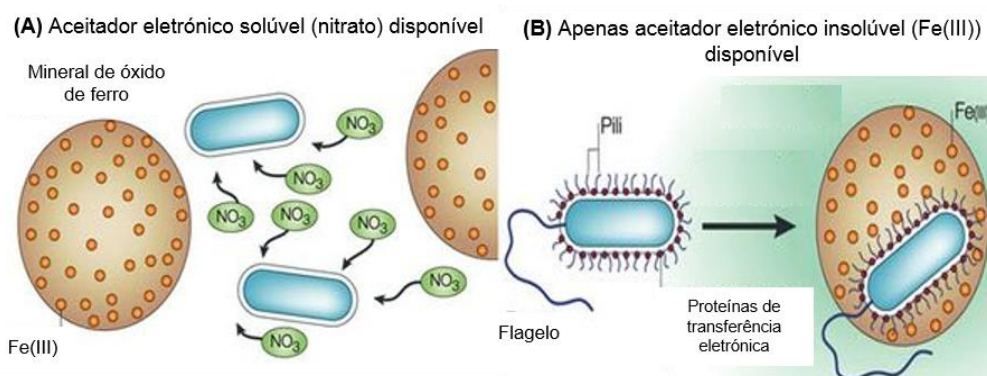
Este trabalho contribui assim para o desenvolvimento de novos métodos de deteção de bactérias eletroquimicamente ativas, no sentido de otimizar as aplicações em que estas bactérias podem ser utilizadas.



## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Micro-organismos redutores de óxidos metálicos

A obtenção de energia que suporta o crescimento microbiano dá-se pela oxidação de matéria orgânica e subsequente transferência dos elétrons através da forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), numa cadeia de transporte eletrónico. A transferência destes elétrons pelos vários intermediários da cadeia respiratória, até ao aceitador final, é acoplada com a transferência de prótons (íões  $H^+$ ) através da membrana celular, gerando um gradiente de prótons que leva à síntese de adenosina trifosfato (ATP). Os aceitadores finais de elétrons são, na maior parte dos casos, solúveis como por exemplo, o fumarato, o nitrato, o sulfato ou oxigénio (Figura 2.1 – A).<sup>[1,2]</sup> No entanto, alguns micro-organismos conseguem, quando não têm aceitadores eletrónicos solúveis disponíveis, utilizar compostos insolúveis como aceitadores eletrónicos finais (Figura 2.1 – B). Nesta situação, estes micro-organismos enviam os elétrons para o exterior reduzindo, por exemplo, óxidos metálicos (e.g., óxidos de ferro, óxidos de manganês, etc.).<sup>[2–5]</sup> Este tipo de micro-organismos denominam-se micro-organismos redutores de óxidos metálicos.



**Figura 2.1. Transferência eletrónica dos micro-organismos redutores de óxidos metálicos. (A) Transferência eletrónica para aceitadores solúveis; (B) Transferência eletrónica para aceitadores insolúveis. Adaptado de D. R. Lovley.<sup>[6]</sup>**

Estes micro-organismos podem ser encontrados em diversos ambientes estratificados, como por exemplo, oceanos, lagos e sedimentos fluviais, assim como em águas residuais domésticas e industriais.<sup>[7]</sup> Nestes ambientes, o oxigénio é rapidamente consumido pelos organismos residentes nas camadas superiores das colunas de água e/ou sedimentos, forçando os micro-organismos redutores de óxidos metálicos, que vivem nas camadas inferiores, à respiração anaeróbia.<sup>[4]</sup>

A elevada diversidade de micro-organismos com esta capacidade indica que a respiração à base de óxidos metálicos terá sido um dos primeiros processos respiratórios a ter ocorrido na Terra. Estes organismos podem ser encontrados tanto nos domínios *Archaea* e *Bacteria*, como também em várias subdivisões das proteobactérias.<sup>[4]</sup>

Esta capacidade de redução extracelular de óxidos metálicos acoplada à oxidação de matéria orgânica torna estes organismos excelentes candidatos para serem usados na degradação de contaminantes orgânicos e na remediação de contaminantes metálicos.<sup>[8]</sup>

## 2.2. Bactérias eletroquimicamente ativas

A capacidade única de transferência eletrônica extracelular (TEE), descrita anteriormente, pode também estender-se a elétrodos metálicos associados a células de combustível microbianas (MFC, do inglês *Microbial Fuel Cell*), permitindo que estes micro-organismos consigam associar o seu crescimento à produção de energia elétrica. As bactérias com esta capacidade denominam-se bactérias eletroquimicamente ativas (EAB, do inglês *Electrochemically Active Bacteria*).<sup>[2,9,10]</sup>

É importante referir que todas as EAB são micro-organismos redutores de óxidos metálicos, mas nem todos os micro-organismos redutores de óxidos metálicos são bactérias eletroquimicamente ativas. *Pelobacter carbinolicus* é um micro-organismo capaz de reduzir óxidos metálicos, mas que não é capaz de usar um elétrodo metálico como aceitador final de eletrões e, consequentemente, não tem capacidade para produzir eletricidade.<sup>[11]</sup>

As EAB são de grande interesse para a comunidade científica devido ao seu papel em vários fenómenos geobiológicos (degradação da matéria orgânica e ciclo de nutrientes nos solos e sedimentos)<sup>[3,4]</sup> e ao seu potencial uso em vários campos: produção de energia sustentável, biotecnologia e biorremediação.<sup>[5,12]</sup> Os organismos que têm sido um maior objeto de interesse e consequente investigação pertencem aos géneros *Geobacter*, *Shewanella*, *Clostridium*, *Aeromonas*, *Rhodospirillum* e *Desulfobulbus*.<sup>[5]</sup>

A descoberta de que alguns micro-organismos conseguem produzir eletricidade remonta a 1910/11, por M. Potter. Ele afirmou que “A desintegração de compostos orgânicos por micro-organismos é acompanhada pela libertação de energia elétrica”, (do inglês, “*The disintegration of organic compounds by microorganisms is accompanied by the liberation of electrical energy.*”).<sup>[13]</sup> Em 1931, esta descoberta foi explorada por B. Cohen que conseguiu obter uma tensão de 35 V ao ligar MFCs em série. O desenvolvimento destas células de combustível teve o seu maior salto nos anos 60 quando a NASA (do inglês, *National Aeronautics and Space Administration*) mostrou interesse em transformar os desperdícios orgânicos em eletricidade, durante os seus voos espaciais. Em 1963, as primeiras células de combustível microbianas começaram a ser comercializadas como fontes de energia alternativas para serem utilizadas em equipamentos marinhos. Contudo, devido ao baixo custo dos combustíveis fósseis, o desenvolvimento destas células de combustível microbianas acabaria por estagnar. Mais tarde, durante a crise do petróleo nos anos 70 e 80, o interesse nesta fonte de energia alternativa renasceu.<sup>[12,14]</sup>

### 2.2.1. Aplicações

#### Células de combustível microbiana

As células de combustível microbianas (Figura 2.2) convertem a energia química, armazenada na matéria orgânica, em energia elétrica. Esta conversão ocorre por via de reações catalíticas operadas



pelas EAB que crescem em condições anaeróbias na superfície de eletrodos.<sup>[14,15]</sup> Virtualmente, qualquer fonte de matéria orgânica pode ser usada numa MFC, incluindo moléculas simples, como hidratos de carbono e proteínas, assim como misturas complexas de matéria orgânica presentes em águas residuais domésticas e industriais.<sup>[16]</sup> A MFC é composta por dois compartimentos, o do ânodo e o do cátodo, separados por uma membrana permeável a protões. No compartimento do ânodo, as EAB oxidam o substrato e produzem eletrões e protões. Os eletrões são recebidos pelo ânodo a partir do qual fluem por um circuito externo para o cátodo, alimentando de energia o dispositivo elétrico, e os protões são transferidos internamente para o compartimento catódico, através da membrana permeável a protões. Os eletrões e os protões são consumidos no compartimento do cátodo reagindo com o oxigénio dissolvido no eletrólito, produzindo água.<sup>[12,17]</sup> Utilizando a glucose como exemplo, as reações (2.1) e (2.2) ocorrem no ânodo e no cátodo, respetivamente:<sup>[18]</sup>

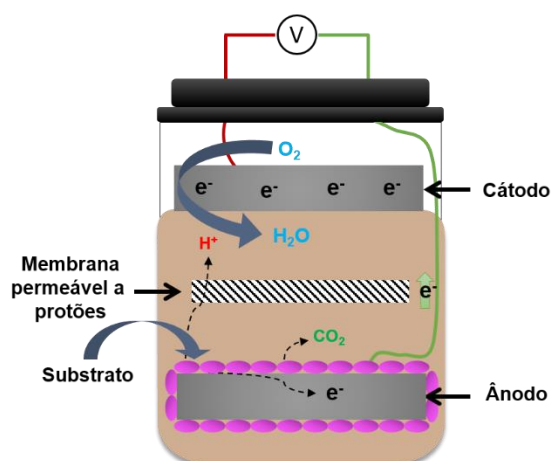
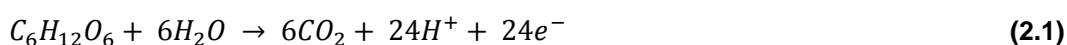


Figura 2.2 Esquema ilustrativo de uma célula de combustível microbiana.

A produção de eletricidade nas MFCs pode ser associada a várias aplicações, como por exemplo, tratamento de águas residuais e extração de metais de minerais:<sup>[12,14,17]</sup>

(i) tratamento de águas residuais: existem já sistemas MFC<sup>[12,14]</sup> à escala piloto para o tratamento de águas residuais, tendo-se atingido remoções entre 60 e 95 % de matéria orgânica solúvel, expresso em CBO (Carência Bioquímica de Oxigénio<sup>1</sup>). Estes sistemas são vantajosos em relação aos sistemas aeróbios, designadamente em processos de lamas ativadas, os quais são economicamente dispendiosos, dado o elevado consumo de energia principalmente nos mecanismos de mistura e arejamento, além dos problemas associados às emissões de carbono. No entanto, continuam a

<sup>1</sup> Quantidade de oxigénio consumido na degradação da matéria orgânica por processos biológicos, sendo expresso em mg/L.

predominar em resultado da sua facilidade de operação e qualidade do efluente final, ainda que os sistemas anaeróbios também sejam viáveis em efluentes pouco concentrados e, ainda melhor, em efluentes alimentares concentrados;

(ii) extração de metais de minerais: os metais podem ser extraídos dos minerais quando são utilizados como os aceitadores finais de eletrões, na câmara catódica de uma MFC.<sup>[12]</sup>

O uso das MFCs para a produção de energia a partir de matéria orgânica apresenta várias vantagens em relação às células de combustível químicas: (i) a transformação direta da energia dos substratos (presente nas ligações químicas) em energia elétrica possibilita uma elevada eficiência de conversão; (ii) podem usar uma grande diversidade de substratos; (iii) os produtos secundários – dióxido de carbono e água – não são considerados contaminantes; (iv) têm o potencial para serem usadas em locais remotos sem infraestruturas elétricas<sup>[18]</sup> e (v) as aplicações das MFCs são autossustentáveis, uma vez que, a energia elétrica necessária é produzida como produto secundário.<sup>[19]</sup>

### **Células de eletrólise microbianas**

As bactérias eletroquimicamente ativas podem também ser usadas em células de eletrólise microbianas (MEC, do inglês *Microbial Electrolisys Cell*). Nas MECs a energia elétrica adicional é usada na produção de biocombustíveis como o hidrogénio e o etanol, ou produtos químicos como o peróxido de hidrogénio ou produtos cáusticos. Numa MFC clássica, durante a produção de corrente, os eletrões e prótons provenientes da oxidação dos substratos pelas EAB fluem para o cátodo e são consumidos num mecanismo de redução. Quando a presença de compostos redutíveis é suprimida, a produção de corrente deixa de ser espontânea. Ao aplicar-se uma pequena voltagem entre o ânodo e o cátodo, a produção de corrente é forçada, resultando na produção de hidrogénio no compartimento catódico devido à redução dos prótons ou etanol se houver acetato dissolvido. Por este mesmo processo é também possível produzir outros produtos químicos, dependendo do substrato dissolvido no compartimento catódico.<sup>[12]</sup>

### **Biorremediação**

A biorremediação é o processo no qual organismos vivos tais como, bactérias, são utilizados para reduzir ou remover (remediar) contaminantes do meio-ambiente. A capacidade das EAB para reduzir óxidos de metais pesados, como por exemplo, crómio e urânio, mercúrio, arsénio, etc., faz com que estas desempenhem um papel importante na biorremediação de águas subterrâneas e solos contaminados. A remoção dos metais tóxicos e metalóides ocorre por conversão dos metais para formas que precipitem e/ou formas volatilizáveis.<sup>[4,8,12,20–22]</sup>

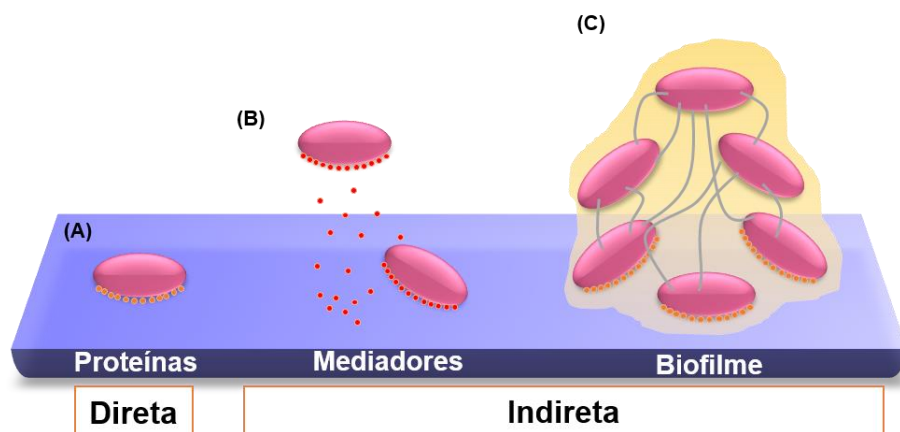
### **Outras aplicações**

Outras potenciais aplicações destas bactérias incluem: sensores autónomos para operações de longo-termo em regiões com pouca acessibilidade, plataformas móveis robot/sensor, sistemas microscópios de entrega de medicamentos (*drug-delivery*) e dessalinização da água do mar.<sup>[12,17]</sup>

### 2.2.2. Mecanismos de transferência eletrônica extracelular

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de melhor compreender o processo de transferência eletrônica, entre as bactérias eletroquimicamente ativas e os aceitadores eletrônicos insolúveis, especialmente os ânodos das MFCs, de forma a otimizar a produção de eletricidade.<sup>[12,19,23]</sup>

Os mecanismos descritos, até à data, afirmam que os elétrons podem ser transferidos por transferência direta ou indireta. Quando as células estão em contacto com o aceitador eletrônico, os elétrons provenientes da oxidação do substrato são transferidos através da membrana citoplasmática, periplasma e membrana externa pelas proteínas de transporte eletrônico, como os citocromos de tipo c (transferência direta) (Figura 2.3 – A). Quando as células não estão em contacto com o aceitador eletrônico, a TEE pode ocorrer por meio de mediadores redox (Figura 2.3 – B) ou por nanofios proteicos quando há formação de biofilmes na superfície do aceitador eletrônico (Figura 2.3 – C) (transferência indireta). Os mediadores redox podem ser secretados pela própria bactéria ou podem ser exógenos. O mediador redox, no estado oxidado, aceita os elétrons provenientes do metabolismo celular e abioticamente transfere os elétrons para o aceitador final. O mediador é reoxidado sendo submetido a repetidos ciclos de redução-oxidação. No caso da transferência eletrônica indireta por nanofios, os elétrons são transferidos de célula para célula pelos nanofios até chegarem às células que estão em contacto direto com o aceitador eletrônico, ocorrendo no final uma transferência direta mediada pelas proteínas de transporte eletrônico.<sup>[12,23,24]</sup>



**Figura 2.3** Tipos de transferência eletrônica entre as bactérias eletroquimicamente ativas e os aceitadores eletrônicos insolúveis (filme a roxo): (A) Transferência eletrônica direta; (B) Transferência eletrônica por mediadores eletroquímicos; (C) Transferência eletrônica por formação de biofilmes. Adaptado de A. P. Borolo, *et al.*<sup>[23]</sup>

Embora estes mecanismos de transferência eletrônica extracelular estejam já descritos pensa-se que poderão existir outros mecanismos, dado que estes dependem do tipo de aceitador eletrônico e da bactéria eletroquimicamente ativa. Além disso, sabe-se que nem todas as bactérias que conseguem reduzir minerais conseguem produzir eletricidade, o que sugere mais uma vez a existência de outros mecanismos ainda não identificados.<sup>[11,24]</sup>

### 2.2.3. A bactéria *Geobacter sulfurreducens*: fisiologia, ecologia e aplicações

A bactéria *Geobacter sulfurreducens* (*G. sulfurreducens*) (Figura 2.4) é usada como prova de conceito no método de detecção colorimétrico desenvolvido neste trabalho. Na Tabela 2.1 estão sumariadas as principais características da bactéria.

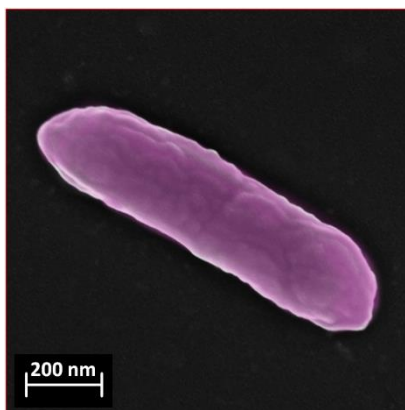


Figura 2.4 Imagem da bactéria *Geobacter sulfurreducens* obtida por microscopia eletrônica de varrimento.

Este organismo pertence à categoria das bactérias Gram-negativas e é uma das espécies mais estudadas do género *Geobacter*, estando disponíveis para consulta: o sistema genético, a sequência de genoma completa, *microarrays* do genoma completo e dados de análises proteómicas efetuadas na presença de vários doadores e aceptadores de eletrões.<sup>[25]</sup>

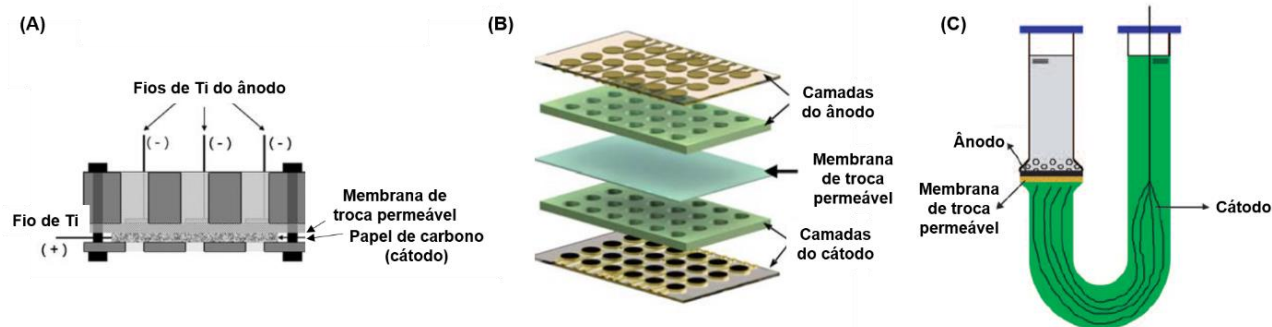
Tabela 2.1 Características principais da bactéria *Geobacter sulfurreducens*.<sup>[25]</sup>

Filogenia	Distribuição	Transferência eletrónica	Aplicações
<ul style="list-style-type: none"><li>- Ordem: <i>Desulfuromonadales</i></li><li>- Classe: <i>Deltaproteobacteria</i></li><li>- Filo: <i>Proteobacteria</i></li><li>- Domínio: <i>Bacteria</i></li><li>- Família: <i>Geobacteraceae</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Sedimentos aquáticos</li><li>- Pantanaís</li><li>- Aquíferos</li><li>- Águas subterrâneas</li><li>- Sedimentos de água doce</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- <u>Aceptadores eletrónicos</u>:</li><li>- Solúveis: fumarato, nitrato e compostos clorinados</li><li>- Insolúveis: Fe (III) e Mn (IV) na forma de óxidos, elétrodos metálicos, U (VI), etc.</li><li>- <u>Doadores eletrónicos</u>: acetato, outros ácidos gordos, Fe (II), U (IV), elétrodos, etc.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Biorremediação: compostos aromáticos, U (VI) e metais e metalóides relacionados</li><li>- Produção de metano a partir de desperdícios orgânicos</li><li>- Produção de eletricidade (MFC)</li></ul>

### 2.3. Métodos de detecção: Estado da arte

Apesar de um número crescente de EAB já ter sido identificado, isolado e caracterizado,<sup>[19,26–34]</sup> este número é ainda muito limitado em relação à ubiquidade das bactérias existentes no meio-ambiente.<sup>[35]</sup> Este facto tem restringido substancialmente os conhecimentos fundamentais sobre estas bactérias e sobre o seu papel no meio-ambiente.

Atualmente, os principais métodos de detecção destes organismos baseiam-se na sua capacidade de produzir eletricidade. Alguns exemplos são os ensaios de rastreamento baseados na produção de tensão (Figura 2.5 – A), conjuntos de múltiplas MFCs microfabricadas (Figura 2.5 – B) e MFCs em forma de U (Figura 2.5 – C). No entanto, estes métodos têm a desvantagem de serem relativamente lentos (~ 5 a 6 dias) e de serem necessários materiais que necessitam de alterações para a construção dos dispositivos de detecção, tornando-se dispendiosos.<sup>[17,30,35,36]</sup>



**Figura 2.5 Métodos de detecção de bactérias eletroquimicamente ativas baseados nos princípios das MFCs. (A) método de rastreamento baseado na medição da tensão; (B) múltiplas MFCs microfabricadas; (C) MFC em forma de U. Adaptado de H. Hou, *et al*; Y. Zuo, *et al*; J. Biffinger, *et al*.<sup>[17,30,36]</sup>**

## 2.4. Papel

O papel é um material fino e flexível, constituído maioritariamente por uma rede de fibras de celulose que se mantêm unidas fisicamente pelo entrelaçamento das mesmas e, quimicamente por pontes de hidrogénio. Sendo um material bastante versátil é utilizado em inúmeras aplicações, como por exemplo, na escrita e impressão, em embalagens, em utilitários (lenços de papel, papel higiénico, etc.), como meio de informação, entre outros. Recentemente, tem emergido como suporte para sensores biológicos na detecção de vários analitos (*e.g.* glucose, proteínas, biomarcadores e sequências de ADN), devido principalmente ao seu baixo custo, à sua simplicidade de uso, ao facto de poderem ser descartáveis e poderem ser usados facilmente em situações *point-of-care* em países subdesenvolvidos.<sup>[37]</sup>

O início da história do papel remonta a 2200 a.C. com a invenção do papiro pelos Egípcios, que era fabricado a partir de finas tiras da parte interna do caule da plante de papiro, *Cyperus papyrus*. O papiro era utilizado como meio de escrita na antiguidade, sobretudo no Antigo Egipto, no Oriente Médio e na Civilização greco-romana e é considerado o precursor do papel. A invenção do processo de fabrico do papel é atribuída a T'sai Lun, ministro da agricultura do imperador Ho Ti's da China. Em 105 d.C. T'sai Lun produziu com sucesso papel por meio da polpação de redes de pesca e trapos, e mais tarde usando fibras vegetais. Os espécimes que chegaram até aos nossos dias provam que o papel produzido pelos antigos chineses era de alta qualidade, o que permite, até mesmo, compará-lo ao papel feito atualmente. Em 751 d.C. o povo árabe apropriou-se do segredo do processo de fabrico de papel pela troca de prisioneiros chineses. Com a expansão muçulmana o segredo alastrou-se, o que possibilitou uma rápida evolução do processo de fabrico de papel, devido à grande utilidade e crescente interesse pela descoberta. A industrialização do papel ocorreu em 1085 e foi marcada pela implementação dos primeiros moinhos papeleros em Xativa e Toledo, em Espanha.<sup>[38,39]</sup>

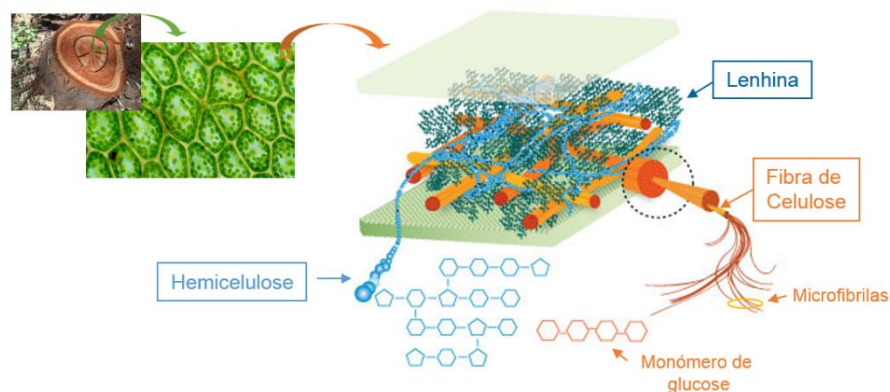
Visto que o papel é o material utilizado como suporte no método de deteção colorimétrico desenvolvido neste trabalho, será dada uma descrição mais detalhada sobre o seu processo de fabrico e afins.

#### 2.4.1. Fabrico do papel

##### Matérias-primas

Como mencionado anteriormente a principal matéria-prima usada no fabrico do papel é a celulose.<sup>[38,40]</sup> Este polímero é o mais abundante na natureza e é composto por monómeros de glucose ligados linear e covalentemente por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. A celulose existente na pasta de papel tem normalmente cadeias compostas por 300 a 1700 unidades de glucose. A celulose é um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas, onde se organiza sob a forma de microfibrilas que formam a unidade cristalina da celulose (Figura 2.6). Quimicamente são as ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo dos monómeros de glucose que constituem a forte interação existente entre as cadeias de celulose levando à formação das microfibrilas (são também estas as ligações responsáveis pela interação das fibras na formação da folha de papel).<sup>[38,41]</sup> Outros dois componentes principais das paredes celulares vegetais são a hemicelulose e a lenhina, que ajudam a manter as fibras de celulose juntas. A hemicelulose é um heteropolímero, formado por pentoses e hexoses, que, ao contrário da celulose, tem uma estrutura amorfa com ligações fracas entre os seus monómeros. A matriz que forma para envolver as fibras de celulose caracteriza-se por pontes de hidrogénio e ligações de *Van der Waals*, que desempenham um papel importante na ligação entre a celulose cristalina e a lenhina amorfa, necessária para o reforço do material fibroso.<sup>[41]</sup> A lenhina é um polímero aromático hidrofóbico com uma estrutura extremamente complexa. No processo de fabrico do papel esta é normalmente removida, visto que é fotossensível conferindo ao papel fragilidade e uma cor amarelada (e.g. papel do jornal). Pelo contrário, a hemicelulose é benéfica para as propriedades do papel, como por exemplo, por lhe conferir resistência à tração.<sup>[41]</sup>

O material mais usado como fonte de celulose é a madeira de árvores como os eucaliptos e/ou pinheiros, devido ao seu baixo custo e facilidade de obtenção, e possuem cerca de 40 – 50% de celulose apropriada para uso na produção de papel. No fabrico do papel são predominantemente utilizados dois tipos de madeira: a madeira dura que provém de plantas angiospérmicas, como o eucalipto, ou a madeira macia que provém de plantas gimnospérmicas, como o pinheiro, o cipreste ou a sequoia. As fibras de celulose da madeira dura são curtas (~ 1 mm), baratas e conferem ao papel boas características de impressão. Por outro lado, as fibras de celulose extraídas da madeira macia são mais longas (~ 3 mm) e de maior qualidade, o que leva à formação de um papel mais coeso e resistente.<sup>[38,41]</sup>



**Figura 2.6 Constituição da parede celular vegetal. Origem das fibras de celulose.**

Na Tabela 2.2 estão representadas as percentagens dos principais constituintes da parede celular das células vegetais da madeira.<sup>[38]</sup>

**Tabela 2.2 Constituintes principais da parede celular vegetal da madeira.**

Constituintes	Quantidade (%)
<b>Celulose</b>	~ 50
<b>Hemicelulose</b>	~ 20
<b>Lenhina</b>	~ 15 a 25
<b>Outros constituintes</b>	<10

Para além da madeira existem outras plantas das quais podem ser extraídas fibras de celulose, como por exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar, bambu, juta, cânhamo, linho, algodão e também algumas gramíneas como trigo, a cevada ou o arroz. Contudo, estas fontes alternativas de celulose representam uma percentagem muito pequena do volume de fibras usadas na produção do papel, em comparação com a celulose proveniente das árvores, uma vez que possuem um custo mais elevado.<sup>[38,40,41]</sup>

### **Etapas do processo de fabrico de uma folha de papel**

(i) Formação da pasta de celulose: esta etapa pode ser realizada por um processo químico ou mecânico:

- **Polpação mecânica**: trituração da madeira até esta se tornar numa polpa. Este processo é bastante eficiente e consegue converter pelo menos 90% da madeira em polpa. Contudo, a polpa resultante contém grande parte da lenhina, fazendo com que o papel resultante fique com uma cor amarelada ou acastanhado quando exposto a luz. Este processo tende também a produzir fibras curtas e rígidas o que leva à produção de uma folha de papel frágil. Por esta razão, a polpação mecânica é usada principalmente para a produção de embalagens, folhas de jornal e outras aplicações que não requerem papel muito resistente.<sup>[39,41,42]</sup>
- **Polpação química**: este método usa agentes químicos, calor e pressão para dissolver a lenhina presente na madeira, libertando as fibras de celulose. No processo de *Kraft*, a madeira e os agentes químicos são aquecidos num digestor para remover açúcares, 90 a 95% de lenhina e outros constituintes que não sejam necessários ao produto final. Os resíduos do digestor são

conhecidos por licor negro, e é normalmente utilizado como fonte de energia pela própria fábrica. Um processo mais convencional, à base de sulfitos (*sulfite pulping*) é usado numa pequena percentagem de fábricas de produção de papel, cerca de 2%, onde são usados agentes ácidos para modificar a estrutura química da lenhina, que é depois lavada da celulose.<sup>[38,39,41,42]</sup>

(ii) Pré-tratamento das fibras: a polpa é diluída com água, cerca de 99%, e a mistura passa por dois processos:<sup>[39,42]</sup>

- **Dispersão**: assegura a separação uniforme das fibras da pasta na suspensão aquosa;
- **Refinação**: processo que obriga as fibras em suspensão a passar entre duas placas metálicas, uma móvel e uma estacionária, alterando as características das fibras de celulose através de processos mecânicos e hidráulicos, influenciando as propriedades da folha de papel. Quando as fibras não passam por este processo, a folha de papel resultante é pouco coesa, muito volumosa, com elevada capacidade de absorção, elevada porosidade e opacidade e com uma estrutura irregular.

(iii) Adição de aditivos: assegura o melhoramento da qualidade do papel a nível de massa, opacidade, brancura e características de impressão. A tendência na indústria do papel é a de aumentar a quantidade de aditivos e baixar a de fibras, de forma a reduzir os custos de produção.<sup>[41,43]</sup>

(iv) Formação da folha de papel: remoção da água num tapete equipado com drenagem simples e vácuo. De seguida, a pasta é prensada, seca e por fim bobinada em grandes rolos. Neste circuito os processos de secagem são variados, incluindo também a passagem por soluções que aplicam tratamentos superficiais ao papel<sup>[41]</sup> (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3 Constituição de uma folha de papel. Discriminação dos aditivos utilizados e respetiva função.**

Constituinte		Quantidade (%)	Função
Fibras de celulose		~ 70	Principal constituinte
Carbonato de cálcio (CaCO <sub>3</sub> )		~ 20	Controla as características óticas
Aditivos na massa	Amido catiónico de batata	~ 10	Controla a resistência interna
	OBA ( <i>Optical Brightener Agent</i> )		Agente branqueador
	ASA ( <i>Alkyl Succinic Anhydride</i> )		Controla a penetração de líquidos
	Corantes (azul e violeta)		Controla a tonalidade
Aditivos na superfície	Amido de milho		Controla a resistência superficial
	OBA ( <i>Optical Brightner Agent</i> )		Agente branqueador
	AKD ( <i>Alkyl Ketene Dimer</i> )		Controla a penetração de líquidos
	Sal (NaCl)		Controla as características elétricas

**Nota:** estas informações foram gentilmente cedidas pela Portucel, Soporcel.

## 2.5. Métodos de deteção colorimétrica

A tecnologia de deteção colorimétrica constitui um meio atrativo para a rápida deteção de analitos como por exemplo, sequências de ADN<sup>[44–47]</sup>, proteínas<sup>[47–49]</sup> ou compostos químicos/iões<sup>[47,50]</sup>. No âmbito



do desenvolvimento de um sensor de papel colorimétrico descrito neste trabalho, o fenómeno de eletrocromismo é utilizado na deteção das EAB.

## 2.6. Eletrocromismo

O eletrocromismo é uma propriedade característica de alguns materiais que consiste na mudança das suas propriedades óticas em resposta a um estímulo elétrico na forma de corrente ou potencial.<sup>[51–54]</sup> Esta propriedade torna-os adequados para serem usados em diversas aplicações, tendo sido algumas delas já desenvolvidas no CENIMAT (Centro de Investigação de Materiais), como por exemplo, janelas de eficiência energética para controlo de intensidade dos raios solares em automóveis, aviões e/ou edifícios<sup>[55]</sup> (Figura 2.7 – A), matrizes passivas de materiais eletrocrómicos impressos em substratos flexíveis, desenvolvida no âmbito do projeto SMART-EC (FP7-ICT-2009.3.9/258203) (Figura 2.7 – B), protótipo de um sensor de gás com materiais eletrocrómicos impresso em papel, desenvolvida no âmbito do projeto A3PLE (FP7-NMP-2010-SME/262782-2) (Figura 2.7 – C) e protótipo de um dispositivo eletrocrómico em papel para utilização em etiquetas inteligentes, desenvolvido no âmbito do projeto INVISIBLE ERC Nº 228144 (Figura 2.7 – D).<sup>[51–53]</sup>

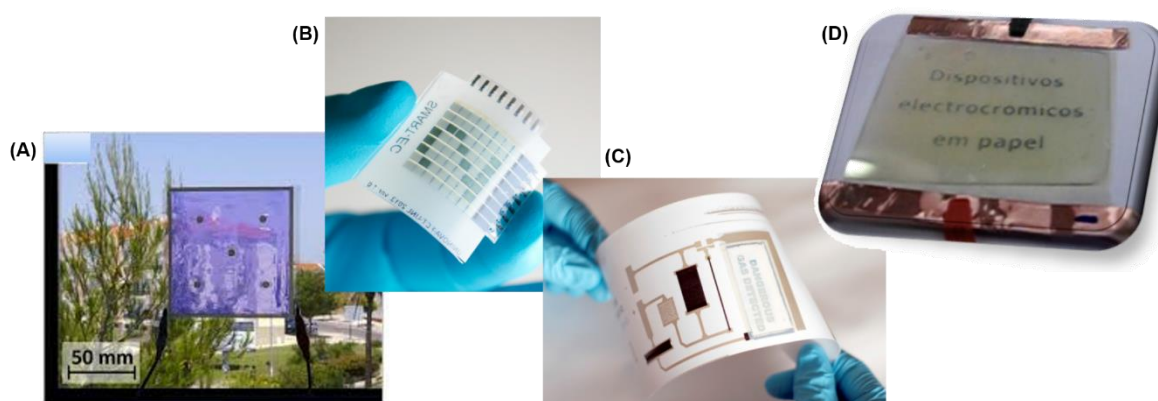


Figura 2.7 Algumas das aplicações dos materiais eletrocrómicos desenvolvidas no CENIMAT.

### 2.6.1. Materiais eletrocrómicos

A história da coloração em materiais remonta ao século XVIII, em 1704, quando J. J. Diesbach descobriu o azul da Prússia (hexacianoferrato), que muda de transparente para azul através da oxidação do ferro. Mais de 100 anos depois, em 1815, J. J. Berzelius reportou que o trióxido de tungsténio ( $\text{WO}_3$ ) muda de cor quando é aquecido numa atmosfera de hidrogénio. Em 1929, F. H. Smith patenteou o primeiro dispositivo eletrocrómico baseado numa reação eletroquímica com mudança de cor. Nos anos 30, Kobosew e Nekrassow observaram pela primeira vez a coloração eletroquímica no  $\text{WO}_3$  na forma de pó, que ficava azul devido a uma redução eletroquímica numa solução ácida. Em 1951, Brimm *et al*, observaram uma mudança de cor reversível durante o tratamento eletroquímico de um bronze de tungsténio e sódio. A primeira explicação teórica do fenómeno de eletrocromismo foi dada por J. Platt em 1961. Ele explicou que com a aplicação de um campo elétrico externo os espectros de emissão e absorção de certos corantes podem deslocar-se e a mudança brusca de cor pode ser observada devido

ao Efeito de Stark<sup>2</sup>. No entanto, o nascimento da tecnologia eletrocromica é na verdade atribuída a S. K. Deb que descreveu pela primeira vez o mecanismo de coloração do WO<sub>3</sub>, que desde aí tem sido um dos materiais eletrocromicos mais estudados.<sup>[51,53]</sup>

Os materiais eletrocromicos estão agrupados em duas categorias principais: (i) materiais orgânicos e alguns polímeros orgânicos condutores e (ii) materiais inorgânicos. A coloração nos materiais orgânicos ocorre devido a reações redox enquanto que nos materiais inorgânicos ocorre via dupla inserção/desinserção de iões e eletrões dentro do material.<sup>[51,56]</sup>

O processo de inserção de um ião induz a mudanças na distribuição eletrónica da rede cristalina do material eletrocromico, levando a alterações nas suas propriedades óticas.

Consoante a carga do ião inserido dentro da rede do composto o material pode ser anódico ou catódico. Nos materiais anódicos, o ião inserido possui carga negativa (A<sup>-</sup>) e a mudança das suas propriedades óticas ocorre por um processo de oxidação:



No caso dos materiais catódicos o ião inserido possui carga positiva (M<sup>+</sup>) e a mudança de cor ocorre por um processo de redução:



onde MEC representa o material eletrocromico, A<sup>-</sup> representa um anião como OH<sup>-</sup> e M<sup>+</sup> representa um catião como H<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup>, com  $0 < x < 1$ .<sup>[51-53]</sup>

Neste trabalho, o fenómeno de eletrocromismo é explorado numa aplicação diferente das já mencionadas. Como descrito anteriormente, as EAB são capazes de usar aceitadores eletronicos insolúveis, enviando os eletrões para fora das suas células, durante a sua respiração. De forma a detetar a presença destas bactérias, o material eletrocromico catódico, WO<sub>3</sub>, é utilizado como aceitador eletrónico. Ao receber os eletrões e iões positivos, provenientes da degradação de um substrato orgânico pelas EAB, forma um bronze, de forma geral M<sub>x</sub>WO<sub>3</sub> (Equação 2.4), de cor azul, tornando assim possível a deteção colorimétrica destas bactérias.

Este material inorgânico é um dos óxidos de metais de transição mais estudados e é descrito na secção seguinte.

### 2.6.2. Trióxido de tungsténio: propriedades, aplicações e estrutura cristalina e energética

O WO<sub>3</sub> é um semiconductor com excelentes propriedades óticas, como por exemplo, transparência à luz visível.<sup>[57]</sup> Além das suas aplicações em dispositivos eletrocromicos, pode também ser usado na

---

<sup>2</sup> Consiste no deslocamento e na divisão de linhas espectrais de átomos e moléculas perante um campo elétrico externo.

fotocatálise, em sensores de pH e de gases, em baterias secundárias como constituintes de elétrodos, em dispositivos de energia solar e em transístores de emissão de campo.<sup>[57–59]</sup>

O grande interesse nos materiais de  $\text{WO}_3$  vem em parte da sua capacidade de juntar blocos de construção básicos de  $\text{WO}_6$  octaédricos de diversas formas, proporcionando uma grande variedade de estruturas cristalinas.<sup>[56]</sup> A simetria dos blocos de  $\text{WO}_6$  octaédricos pode ser descrita pela estrutura de perovskite com defeito<sup>3</sup> ilustrada na Figura 2.8 – A. Os iões de tungsténio ocupam os vértices de uma célula unitária primitiva e os iões de oxigénio ficam na bissetriz das arestas da célula unitária. O átomo central (C) da célula unitária está ausente, o que proporciona o alojamento de iões. O átomo de tungsténio fica no centro do octaedro no estado de oxidação +6.<sup>[56]</sup>

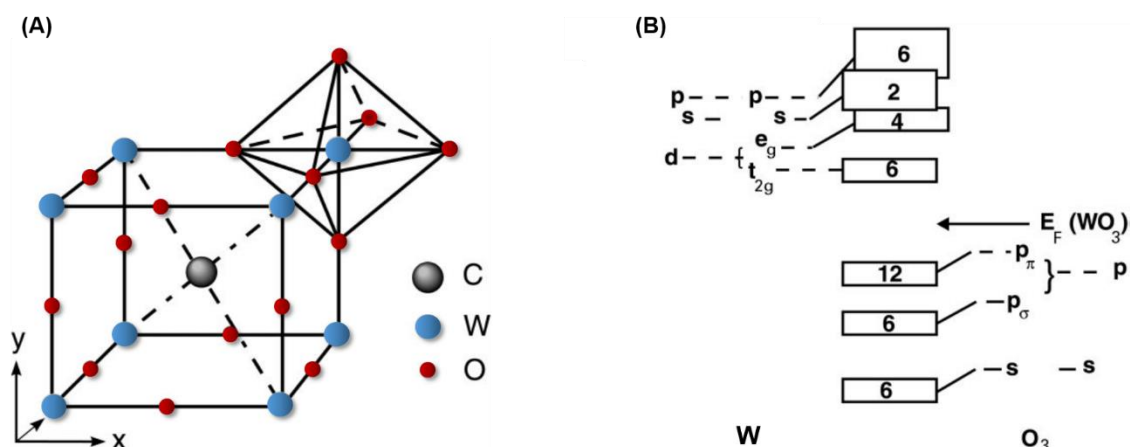


Figura 2.8 (A) Célula unitária da estrutura de perovskite. O átomo C representa a lacuna da estrutura com defeito; (B) Representação esquemática da estrutura das bandas do  $\text{WO}_3$ , correspondente à simetria de perovskite com defeito. Os números representam o número de eletrões máximo em cada nível energético. Adaptado de K. Bange.<sup>[56]</sup>

A estrutura de bandas simplificada para um cristal de  $\text{WO}_3$  é mostrada na Figura 2.8 – B. Os níveis atômicos de energia para o átomo de tungsténio ( $s$ ,  $p$  e  $d$ ) e para o átomo de oxigénio ( $s$  e  $p$ ) estão indicados. A posição dos níveis energéticos é governada tanto pelos valores dos átomos isolados como pelas energias de *Madelung* dos átomos quando localizados nas diferentes posições da rede de perovskite. Cada ião  $\text{W}^{6+}$  é rodeado por seis  $\text{O}^{2-}$  e cada oxigénio é flanqueado linearmente por dois tungsténios. Este arranjo leva à divisão do nível energético  $d$  em dois níveis ( $e_g$  e  $t_{2g}$ ). O número de estados disponíveis para os eletrões é fixada para cada banda e determina o nível de *Fermi* ( $E_F$ ) do  $\text{WO}_3$ , que varia com a estrutura do cristal.<sup>[56]</sup>

### 2.6.3. Óxidos de metais de transição à escala nano

Ao reduzir as dimensões dos óxidos metálicos até à escala nanométrica é possível adaptar as suas características óticas e elétricas, e subseqüentemente melhorar as suas propriedades.<sup>[57,60]</sup> Assim, a

<sup>3</sup> Uma estrutura de perovskite é qualquer material que possui o mesmo tipo de estrutura cristalina que o óxido de titânio e cálcio ( $\text{CaTiO}_3$ ), conhecida pela estrutura de perovskite com o átomo de oxigénio no centro das faces.

síntese de nanopartículas de  $WO_3$  ( $WO_3$  NPs) com dimensões, tamanhos e estruturas cristalinas controladas é de grande importância.<sup>[61]</sup>

As  $WO_3$  NPs podem ser sintetizadas por diferentes métodos, como por exemplo, sol-gel, anodização, pulverização catódica, deposição química e métodos solvotermais.<sup>[62]</sup> Neste trabalho utilizou-se o método solvothermal, cujo solvente foi a água, sendo assim denominado como método hidrotermal.

### Método de síntese hidrotermal

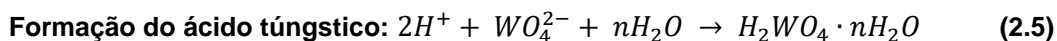
O método de síntese hidrotermal é um processo simples para a síntese de materiais anisotrópicos à escala nanométrica<sup>[57,59,63]</sup>, a partir de solutos em água destilada que são submetidos a elevadas pressões. Isto permite aumentar a solubilidade do sólido e aumentar a velocidade da reação.<sup>[58]</sup> Este método oferece várias vantagens: (i) controlo total sobre a forma e o tamanho; (ii) temperatura de processamento baixa; (iii) elevada homogeneidade; (iv) boa relação custo-desempenho e (v) síntese simples.<sup>[58,59]</sup>

Convencionalmente, a solução precursora é colocada dentro de um autoclave e posteriormente dentro de um forno a temperaturas entre 160 a 200 °C, para atingir pressões elevadas.<sup>[64]</sup> No entanto, embora seja um método muito simples e eficiente apresenta cinéticas de reação ainda lentas devido à baixa temperatura utilizada. Por esta razão, recentemente têm sido feitos esforços de combinação deste método com radiação micro-ondas de forma a acelerar a reação. Ao contrário do método convencional, cujo aquecimento da solução precursora é feito de fora para dentro do autoclave de uma forma indireta, quando é usada a radiação micro-ondas o aquecimento é dielétrico, ou seja, utiliza as propriedades inerentes dos líquidos, sólidos e/ou misturas para converter a energia das micro-ondas *in situ* em aquecimento direto que promove a reação.<sup>[65]</sup> Este tipo de aquecimento permite que seja aquecida água até 100 a 150 °C em apenas 1 a 3 minutos, em contraste com os 60 a 100 minutos que demoraria pelo método convencional, permitindo também poupança de energia.<sup>[65,66]</sup> Devido a estas vantagens, neste trabalho a síntese de  $WO_3$  NPs foi realizada por um método hidrotermal assistido por micro-ondas.

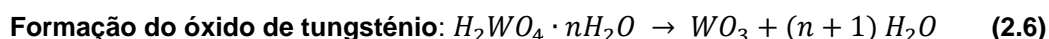
O processo de formação das nanopartículas de  $WO_3$  pode ser descrito em três passos principais:

(i) formação do ácido túngstico:

O ácido túngstico ( $H_2WO_4 \cdot nH_2O$ ) forma-se pela acidificação da solução precursora. Uma vez que este passo é crucial para a iniciação do processo de cristalização, as sínteses foram realizadas a pH inferior a 2 pois acima deste pH não ocorre a formação do ácido.



(ii) formação de agregados de  $WO_3$  pela decomposição do  $H_2WO_4$ :



(iii) crescimento dos núcleos cristalinos de  $WO_3$ .

Uma vez que o método de síntese hidrotermal é bastante dependente das condições experimentais, neste trabalho, foi realizado um estudo sobre a influência de alguns parâmetros na síntese das  $WO_3$  NPs. Os parâmetros estudados foram: precursor da reação, agente direcionador de estrutura e pH da solução.

### 3. DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo é feita a descrição experimental do trabalho realizado, o que englobou a síntese das nanopartículas de  $\text{WO}_3$  que foram utilizadas para impregnar os poços dos sensores de papel fabricados e, o crescimento das bactérias usadas nos ensaios colorimétricos.

#### 3.1. Síntese das nanopartículas de $\text{WO}_3$

Neste trabalho, foi efetuado um estudo sobre a influência de precursores, agentes direcionais de estrutura e pH na síntese das  $\text{WO}_3$  NPs. Com este objetivo foram sintetizadas várias amostras de  $\text{WO}_3$  NPs por um processo hidrotermal com radiação de micro-ondas.

Foram utilizados dois precursores diferentes:  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , obtido comercialmente e PTA que foi preparado através da oxidação de tungstênio metálico com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Numa síntese típica,<sup>[67]</sup> 6 g de pó de tungstênio metálico monocristalino foi adicionado cuidadosamente a 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Devido à natureza altamente exotérmica da reação, a mesma foi feita sob agitação lenta durante 4 horas, dentro de um refrigerador, de forma a manter a temperatura de reação inferior a 10 °C. O pó de tungstênio em excesso foi removido por filtração dando lugar a uma solução transparente. Para remover o excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a solução foi transferida para uma placa de petri que foi colocada numa placa de aquecimento a 65 °C e adicionou-se 50 mL de água destilada aguardando-se até à sua total evaporação. Este procedimento foi repetido várias vezes até ao aparecimento de cristais transparentes alaranjados. Estes cristais foram moídos num almofariz obtendo-se um pó cristalino amarelado correspondente ao PTA ( $\text{WO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ ).

Adicionalmente, nas sínteses com o precursor  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  foram usados dois sais diferentes como agentes direcionais de estrutura (ADE):  $\text{NaCl}$  e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Nas amostras produzidas a partir do precursor PTA apenas se estudou o efeito do pH da solução e não da influência dos agentes direcionais de estrutura. Para cada precursor foram preparadas soluções em água destilada e HCl 3 M para valores de pH finais de 0,0, 0,4 e 1,8, com um volume final de 18 mL. As quantidades usadas de cada reagente estão apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Reagentes e quantidades utilizadas nas soluções iniciais para a síntese das  $\text{WO}_3$  NPs.

Precursor	Quantidade (g)	Agente direcional de estrutura	Quantidade (g)
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,80	$\text{NaCl}$	0,30
		$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0,72
PTA	0,80	-	-

As soluções preparadas foram transferidas para recipientes de 35 mL que foram selados e colocados no micro-ondas (Figura 3.1). As reações de sínteses foram realizadas a uma potência de 100 W, durante um tempo máximo de 60 minutos, até às temperatura e pressão máximas de 200 °C e 300 psi, respetivamente.



Figura 3.1 Micro-ondas utilizado na síntese das WO<sub>3</sub> NPs.

Depois de decorridas as reações, as amostras foram recolhidas por centrifugação (4000 rpm, 30 minutos) tendo sido feitas as lavagens com água destilada, seguido de secagem na estufa (80 °C, 12 horas). Os pós obtidos foram moídos num almofariz até à obtenção de um pó fino e foram armazenados para posteriores caracterizações e desenvolvimento dos sensores colorimétricos.

Os reagentes, materiais e equipamentos utilizados nesta etapa encontram-se indicados em seguida

**Reagentes:** Tungstato de sódio (Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) – Fluka 99,0 %; Ácido clorídrico (HCl) – Sigma-Aldrich 37 %; Cloreto de sódio (NaCl) – MERCK 99,5 %, Sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) – Panreac 99 %; Pó de tungsténio metálico monocristalino (W) – Aldrich 0,6-1 µm, Peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – Panreac 30 %, Água destilada – Milipore

**Material:** Filtro de seringa Roth com 0,45 µm de diâmetro de poro

**Equipamentos:** Refrigerador Bartscher, Placa térmica Heidolph MR Hei-Tec, Balança analítica OHAUS, Micro-ondas Discover Synthesis Platform® da CEM Corporation, Centrifugadora Focus instruments, Estufa EHRET TK 4067

### 3.2. Construção dos sensores de papel

A construção do sensor de papel foi feita segundo a tecnologia *Lab-on-Paper* que consiste na definição de zonas hidrofílicas no papel delimitadas por zonas hidrofóbicas.

O processo de fabricação do sensor de papel dividiu-se em cinco etapas principais:

#### 1) Preparação dos substratos de papel:

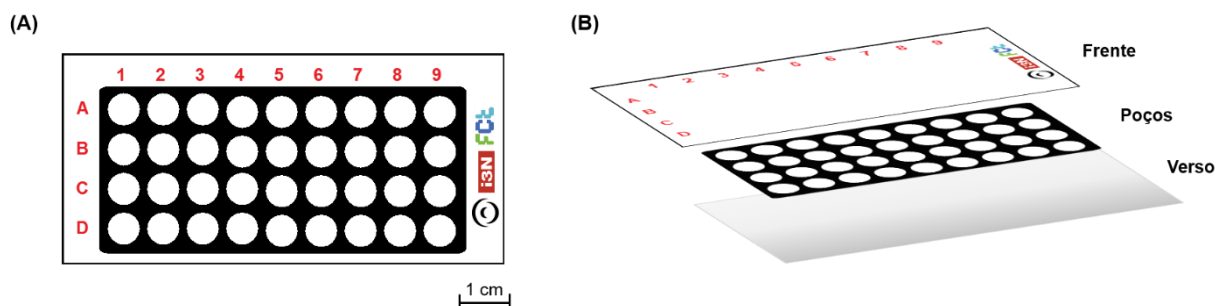
Os dois substratos de papel usados foram: papel Whatman nº 1 e papel de fotocópia.

O papel Whatman nº1, adquirido na forma de folhas de tamanho 570 x 460 mm, foi cortado em folhas de tamanho *standard* A5 (210 x 148 mm). O papel de fotocópia foi usado na forma como foi adquirido, em folhas de tamanho A4 (297 x 210 mm).

Todos os substratos mencionados foram conservados em ambiente seco e não foram submetidos a nenhum tratamento adicional antes de serem utilizados.

## 2) Desenho do protótipo:

O *design* do sensor de papel e dos padrões de cera foram feitos com recurso a um *software* de desenho vetorial – *Adobe Illustrator*. Os poços foram desenhados com largura de linha de 0,5 mm e encontram-se distanciados uns dos outros por 1 mm. A Figura 3.2 ilustra o *design* de um dos sensores de papel produzidos, com poços de dimensões 7 x 7 mm, de forma a assemelharem-se a microplacas convencionais de 96 poços. Além destes, foram também produzidos sensores semelhantes a microplacas de 384 poços, com dimensões de 3,38 x 3,38 mm.

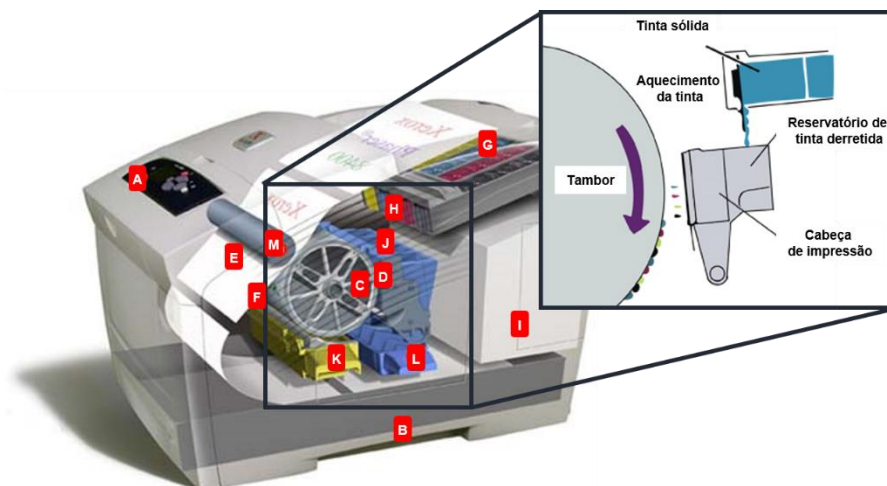


**Figura 3.2** Protótipo do sensor de papel. (A) Parte frontal de um dos protótipos utilizados nos ensaios colorimétricos; (B) Esquema por camadas do sensor de papel produzido.

O desenho foi feito em três camadas diferentes (frente, poços e verso) de forma a facilitar a difusão dos poços da camada interior (Figura 3.2 – B).

## 3) Impressão a cera:

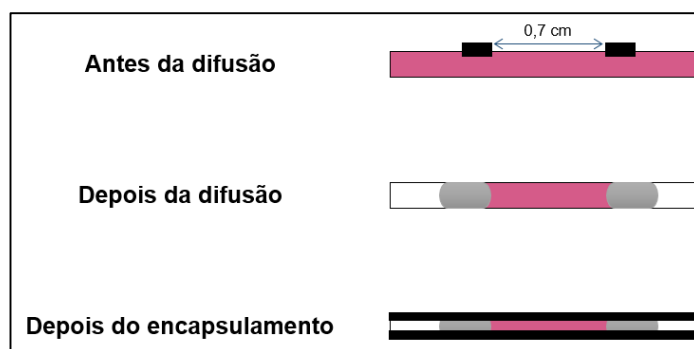
A impressão das três camadas foi feita com a impressora Xerox ColorQube 8570 (Figura 3.3), que utiliza tinteiros de cera sólida em vez dos tinteiros de tinta líquida convencional. A impressora aplica calor de modo a fundir a cera e criar os padrões que são depois transferidos para a superfície do papel.



**Figura 3.3** Representação esquemática da impressora utilizada na produção dos sensores de papel. Ampliação que mostra a tecnologia de derretimento da tinta sólida e passagem para o papel. Legenda: A – painel frontal; B – tabuleiro para o papel; C – tambor de impressão; D – cabeça de impressão; E – percurso do papel; F – pré-aquecedor de papel; G – tinteiros de cera sólida; H – fusão da tinta; I – acesso eletrónico; J – reservatório de tinta derretida; K – kit de manutenção; L – reservatório de resíduos de tinta.

## 4) Difusão da cera no papel:

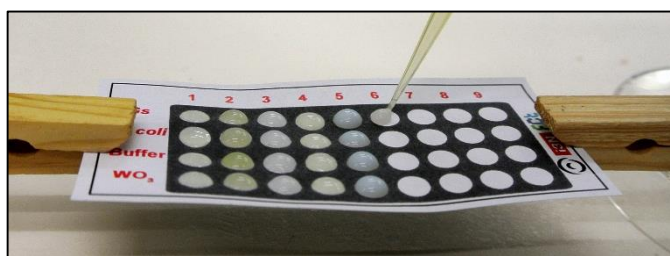
Após a impressão da cera da camada intermédia (poços) do sensor, o papel foi colocado numa placa térmica a 140 °C durante 2 minutos de forma a difundir a cera por toda a espessura do papel. Este método permite criar as zonas hidrofílicas delimitadas por zonas hidrofóbicas. Depois disto o mesmo papel foi novamente colocado na impressora para a impressão da frente e verso, de modo a encapsular os poços. Estas duas camadas não foram difundidas. A Figura 3.4 ilustra o que acontece na superfície do papel antes e depois da difusão da cera e, depois do encapsulamento, quando é depositado um certo volume de líquido.



**Figura 3.4** Esquema ilustrativo do que acontece antes e depois da difusão da cera e depois do encapsulamento. Efeito de cada etapa no confinamento do líquido (representado a rosa) no papel. Os blocos e linhas a preto representam a cera imprimida e os blocos a cinzento a cera difundida.

##### 5) Deposição das soluções WO<sub>3</sub> NPs nos poços dos sensores de papel:

A última etapa da produção do sensor de papel consiste na impregnação dos poços com as soluções de WO<sub>3</sub> NPs sintetizadas, por *drop casting* (Figura 3.5). Para isso foram preparadas dispersões das NPs em água destilada com posterior sonicação durante 2 minutos. Em cada poço foi depositado um certo volume da dispersão de WO<sub>3</sub> NPs e deixou-se secar durante a noite.



**Figura 3.5** Impregnação por *drop casting* dos poços com as nanopartículas de WO<sub>3</sub>.

Os reagentes, materiais e equipamentos utilizados nesta etapa encontram-se indicados em seguida.

**Reagentes:** Água destilada – Milipore, Amostras de WO<sub>3</sub> NPs

**Material:** Papel Whatman nº 1, Papel de fotocópia 300 % Portucel

**Equipamentos:** Impressora Xerox ColorQube 8570, Placa térmica Heidolph MR Hei-Tec, Sonicador Scansci SONICS vibra-cell



### 3.3. Crescimento bacteriano

No presente trabalho, foram usadas duas estirpes bacterianas: *Geobacter sulfurreducens* (estirpe ATCC 51573/DSM 12127/PCA) e *Escherichia coli* (estirpe BL21 (DE3)).

A bactéria *G. sulfurreducens* foi usada como EAB e a bactéria *E. coli* como controlo negativo.

#### 3.3.1. Crescimento da bactéria *Geobacter sulfurreducens*

O crescimento da *G. sulfurreducens* foi feito em meio líquido NBAF (0,04 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,10 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,80 g/L  $\text{NaHCO}_3$ , 0,50 g/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,19 mg/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ , DL vitaminas, 100X NB sais e elixir de minerais NB com 10 mM  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  como o doador de eletrões e 40 mM  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_4$  como o aceitador de eletrões). Para controlar o meio anaeróbico adicionou-se o corante resazurina como indicador uma vez que este é reduzido a resorufina, com uma coloração cor-de-rosa, na presença de oxigénio.

Depois da preparação do meio NBAF este foi transferido para frascos anaeróbios com capacidade de 10 mL e 50 mL, respetivamente. De seguida, foi feito o desarejamento do meio com uma mistura de 8:2 de  $\text{N}_2:\text{CO}_2$ , de acordo com o seguinte protocolo:

- Desarejamento dos tubos anaeróbios:
  - 1) 6 minutos abertos com a agulha mergulhada no líquido;
  - 2) 6 minutos com a tampa de borracha e a agulha mergulhada no líquido;
  - 3) 3 minutos com a tampa de borracha e a agulha acima do líquido.
- Desarejamento das garrafas anaeróbias:
  - 4) 15 minutos abertos com a agulha mergulhada no líquido;
  - 5) 7,5 minutos com a tampa de borracha e a agulha mergulhada no líquido;
  - 6) 3 minutos com a tampa de borracha e a agulha acima do líquido.

O aparato utilizado está indicado na Figura 3.6.

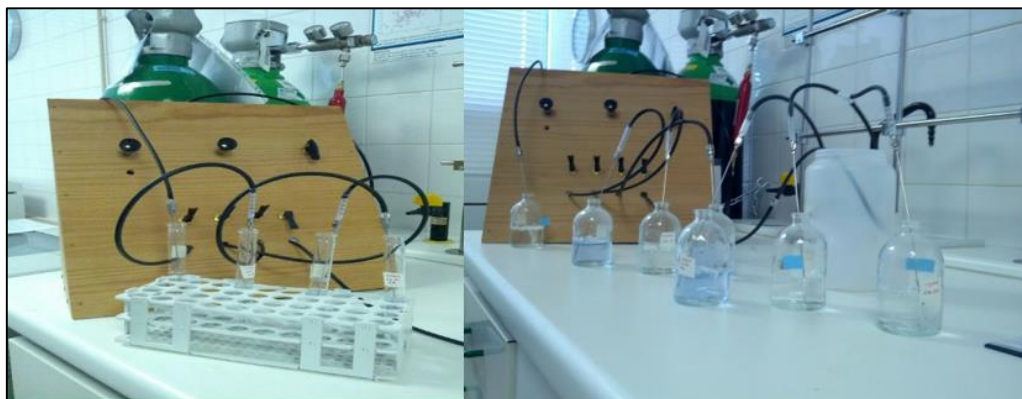


Figura 3.6 Aparato utilizado para o desarejamento do meio NBAF.

Depois de completo este processo, os tubos e as garrafas foram selados com tampas de borracha e cápsulas de alumínio, com o auxílio de um encapsulador. Posteriormente, procedeu-se à autoclavagem

de forma a tornar o meio NBAF estéril. Toda a restante manipulação dos tubos e garrafas com o meio NBAF foi feita à chama de forma a manter a esterilidade.

Antes da inoculação dos tubos com 1 % de cultura de *G. sulfurreducens* e incubação a 30,5 °C, foi adicionado 1 % de cisteína (100 mM, pH 7,0) para reduzir o oxigênio residual presente no meio e 2 % de extrato de levedura, para promover o crescimento das células. Os reagentes, materiais e equipamentos utilizados nesta etapa encontram-se indicados em seguida

**Reagentes:** *Geobacter sulfurreducens* (estirpe ATCC 515873/DSM 12127/PCA), Cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) – Sigma-Aldrich,  $\geq 99$  %, Sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) – Panreac 98 – 102 %, Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) – Cmd Chemicals, Carbonato de sódio monohidratado ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) – Sigma-Aldrich, 99,5 %, Selenato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) – Sigma-Aldrich, 95 %, DL vitaminas, sais NB e elixir de minerais NB, Acetato de sódio trihidratado ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) – Sigma-Aldrich,  $\geq 99$  %, Fumarato de sódio ( $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_4$ ) – Sigma-Aldrich,  $\geq 99$  %, Resazurina – Panreac,  $\lambda_{\text{máx}} = 597 - 620$  nm, Cisteína – Sigma-Aldrich,  $\geq 97$  % e Extrato de levedura - HIMEDIA

**Materiais:** Encapsulador Sopolco analytical, agulhas Cadence science 152,4 mm, tubos (10 mL) e garrafas (50 mL) para crescimento celular em condições anaeróbias e septos de borracha

**Equipamentos:** Placa de agitação VWR, Estufa Binder

### 3.3.2. Caracterização da bactéria *Geobacter sulfurreducens*: curva de crescimento e determinação do peso seco

As garrafas anaeróbias com meio NBAF desarejado foram preparadas com o objetivo de realizar uma curva de crescimento da bactéria *G. sulfurreducens*. Para a realização desta foi inoculado um tubo com 1 % de cultura de *G. sulfurreducens* e incubado a 30 °C até atingir uma absorvância a 600 nm de 0,3. A partir desta suspensão celular inocularam-se três garrafas com 1 % de cultura cada: duas garrafas sem e uma com o corante resazurina – as garrafas sem corante serviram para a medição da absorvância e a garrafa com corante serviu como controlo da manutenção das condições anaeróbias. As garrafas foram incubadas à temperatura de 30 °C e foi medida a absorvância a 600 nm ao longo do tempo, de forma a acompanhar o aumento da densidade celular, até as células chegarem à fase estacionária.

A concentração da bactéria *G. sulfurreducens* utilizada em cada ensaio (peso/volume) foi determinada através de uma reta de calibração em que se relacionou a densidade celular, absorvância no comprimento de onda de 600 nm, com o peso seco da bactéria. Com este objetivo, foi feito um crescimento até à fase estacionária e registou-se o valor da absorvância a 600 nm. Seguidamente, foram feitas diluições sucessivas de 1:1 com respetiva medição dos valores de absorvância. A suspensão celular na fase estacionária foi passada por duas membranas de acetato de celulose, 10 e 20 mL respetivamente, através de filtração a vácuo. Estas membranas e uma membrana sem nada foram deixadas a secar numa estufa a 100 °C durante 24 horas e depois colocadas num exsiccador durante mais 24 horas. As três membranas foram pesadas e subtraiu-se o peso da membrana sem nada às membranas com células da bactéria. A média destas duas massas corresponde ao peso seco da bactéria na fase estacionária. Os restantes pesos secos foram determinados a partir de uma regra de três simples e foi feita a reta de calibração peso seco vs. absorvância.

### 3.3.3. Crescimento da bactéria *Escherichia coli*

O crescimento da *Escherichia coli* foi feito em meio *Luria-Broth* (meio LB) composto por 10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura e 10 g/L NaCl. O meio LB líquido foi transferido para tubos com capacidade para 5 mL de meio. Foram também preparadas pacas de petri com meio LB sólido. Para isso adicionou-se agar ao meio LB líquido preparado previamente. Este meio sólido foi vertido para placas de petri e foi deixado a secar à temperatura ambiente.

Os tubos com o meio líquido e as placas de petri com o meio sólido foram autoclavados durante 20 minutos.

Como o crescimento da *E. coli* é confluyente, antes da inoculação das células no meio líquido foi feito o plaqueamento em meio sólido e usou-se o método de arrastamento para a obtenção de colónias isoladas. A placa de petri foi incubada a 37 °C durante a noite. Seguidamente, repicou-se uma colónia isolada e inoculou-se um tubo com o meio líquido LB. Este tubo foi incubado a 37 °C, 200 rpm durante 18 horas até a cultura celular atingir um valor de Abs<sub>600 nm</sub> ~1,5.

Os reagentes, materiais e equipamentos utilizados nesta etapa encontram-se indicados em seguida.

**Reagentes:** *Escherichia coli* (estirpe BL21 (DE3)), Triptona, Extrato de levedura - HIMEDIA, Cloreto de sódio (NaCl) – Panreac, 99,5 %

**Materiais:** Placas de petri

**Equipamentos:** Incubadora Thermo scientific MaxQ4000

### 3.4. Ensaios colorimétricos

Os ensaios colorimétricos foram realizados em solução e nos sensores de papel produzidos.

Devido à natureza anaeróbia da bactéria usada como EAB todos os ensaios colorimétricos foram efetuados dentro de uma câmara anaeróbica (LABstar Glove Box Workstation, MBRAUN) com O<sub>2</sub> < 0,1 ppm (Figura 3.7).

Nos ensaios colorimétricos a bactéria *G. sulfurreducens* foi utilizada como controlo positivo e a bactéria *E. coli* como controlo negativo. Adicionalmente foi também utilizado como controlo negativo o tampão de ressuspensão e tendo sido efetuados ensaios em branco apenas com as WO<sub>3</sub> NPs.



Figura 3.7 Câmara anaeróbia usada nos ensaios colorimétricos deste trabalho.

#### 3.4.1. Testes em solução

A observação do desenvolvimento da cor azul nas  $\text{WO}_3$  NPs pela ação da bactéria *G. sulfurreducens* foi realizada em primeiro lugar em solução, de forma a validar posteriormente os ensaios colorimétricos em papel. Para isso foram preparadas soluções em água miliQ das  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas. Além disso, foi feito o crescimento das bactérias *G. sulfurreducens* e *E. coli* até à fase exponencial-tardia. Os restantes procedimentos foram efetuados no interior da câmara anaeróbia. Foram retirados 2 mL da suspensão celular de *G. sulfurreducens* e de *E. coli* que foram centrifugados (6000 rpm, 5 minutos) e ressuspensos em 400  $\mu\text{L}$  de tampão (30 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 30 mM KCl e 30 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH 6,53) na ausência de aceitador de eletrões.

Os testes em solução foram realizadas em microplacas de 96 poços e, para cada 100  $\mu\text{L}$  células ressuspensas no tampão, foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{WO}_3$  NPs.

Todos os ensaios foram feitos em triplicado.

#### 3.4.2. Testes em papel

Os testes em papel foram feitos através da adição direta de um certo volume de células ressuspensas no tampão, aos poços de papel respetivos, impregnados previamente com as  $\text{WO}_3$  NPs.

Todos os ensaios foram feitos em triplicado.

Os reagentes, materiais e equipamentos utilizados nesta etapa encontram-se indicados em seguida.

**Reagentes:** Fosfato de sódio dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) – Analar NORMPUR, 99,9 %, Cloreto de potássio (KCl) – Panreac 99,5 – 100,5 %, Acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) – Panreac, 99 – 101 %, Amostras de  $\text{WO}_3$  NPs

**Materiais:** Microplacas de 96 poços VWR, estéreis e com fundo liso ( $V_{\text{máx}} = 360 \mu\text{L}$ )

**Equipamentos:** Centrifugadora ROTH, Câmara anaeróbia LABstar Glove Box Workstation, M.BRAUN

### 3.5. Protocolo para a preparação de amostras biológicas para microscopia eletrónica de varrimento

No decorrer deste trabalho, foram preparadas e vistas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) as células de *G. sulfurreducens* isoladas e em contacto com as  $\text{WO}_3$  NPs. O protocolo para a preparação destas amostras é crucial e foi otimizado de acordo com o descrito de seguida:

1. Transferir 4 mL de suspensão celular para dois *ependorfs* de 2 mL;
2. Centrifugar a 6000 rpm durante 5 minutos e remover o sobrenadante;
3. Ressuspender o sobrenadante em 2 mL de glutaraldeído 3 % em cada *ependorf* e aguardar 2 horas;
6. Centrifugar, remover o sobrenadante e adicionar 2 mL de tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4 a cada *ependorf*;
7. Repetir o ponto 6 mais duas vezes, e na última passagem adicionar apenas 1 mL de tampão;
8. Adicionar o volume dos dois *ependorfs* em um;
9. Nesta fase, a solução pode ser guardada no frigorífico para o dia seguinte;
10. Lavar uma vez com etanol absoluto 70 %, outra com 95 % e três vezes com etanol absoluto 100 %. Esperar 20 minutos entre cada lavagem. (Nota: na segunda lavagem com etanol absoluto 100 % colocar 500  $\mu\text{L}$  e na última lavagem colocar 100  $\mu\text{L}$ );
11. Colocar  $\pm$  uma gota na bolacha de silício monocristalino e adicionar umas gotas de hexametildissilazano (HDMS) (trabalhar na *hotte*) por cima da bolacha, de modo a cobrir toda a superfície, para secar.

**Nota:** no caso da preparação da bactéria em contacto com as  $\text{WO}_3$  NPs o procedimento é o mesmo com um passo inicial adicional: adicionar 600  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{WO}_3$  NPs 5 g/L a 480  $\mu\text{L}$  de suspensão celular e aguardar sensivelmente 30 minutos até ao aparecimento da cor azul; seguir o restante protocolo.

#### Preparação das soluções:

Tampão cacodilato 0,2 M pH 7,4

2,1403 g NaCacodilato, 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (acertar pH)

Tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4

4,28 g NaCacodilato, 200 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (acertar pH)

Glutaraldeído 3 %

12 mL 25 % Glutaraldeído, 38 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 50 mL tampão cacodilato 0,2 M pH 7,4



## 4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

As técnicas de caracterização utilizadas no decorrer deste trabalho foram selecionadas com o intuito de obter informações sobre a estrutura, morfologia e composição química das amostras de WO<sub>3</sub> NPs e dos substratos de papel utilizados. Os substratos de papel foram também caracterizados em termos de hidrofobicidade e analisados termicamente. As amostras biológicas foram caracterizadas em termos de morfologia.

### 4.1. Caracterização estrutural e morfológica

#### 4.1.1. Difração de raios-X

A difração de raios-X (XRD, do inglês *X-rays Diffraction*) é uma técnica não destrutiva usada na análise de materiais cristalinos/policristalinos, na forma de pó, filme ou em *bulk*. Esta técnica permite identificar diferentes estruturas cristalinas presentes num material e analisar as suas propriedades estruturais.

Os raios-X são produzidos quando um elétron de alta energia (gerado no cátodo do tubo catódico) colidir com um alvo metálico (ânodo). A dispersão dos raios-X pela estrutura ordenada de um cristal resulta na interferência entre os raios dispersos, de forma construtiva ou destrutiva, ocorrendo o fenómeno de difração (Figura 4.1). A interferência construtiva das ondas ocorre em ângulos específicos que seguem a lei de *Bragg* descrita pela Equação 4.1,

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (4.1)$$

em que  $n$  é o número de reflexão,  $\lambda$  representa o comprimento de onda da radiação incidente,  $d$  a distância entre os planos cristalinos que dependem da orientação ( $hkl$ ) e  $\theta$  é o ângulo formado entre os planos atômicos e o feixe de raios-X incidente (e difratado)

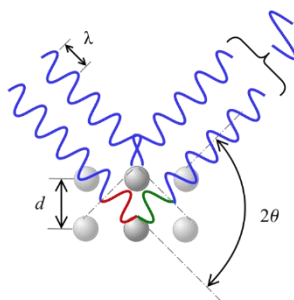


Figura 4.1 Interferência construtiva dos raios-X com o material cristalino.

Variando o ângulo de incidência da radiação e medindo num contador a intensidade do feixe difratado, obtém-se um difratograma, onde as interferências construtivas aparecem na forma de picos.

A determinação da geometria do material pode ser feita graças à comparação do difratograma obtido com um imenso número de estruturas depositadas em bases de dados oficiais.

Neste trabalho, a técnica de DRX foi utilizada para verificar as fases cristalinas das WO<sub>3</sub> NPs, assim como para caracterizar os substratos de papel utilizados. Os difratogramas foram adquiridos num intervalo de 2 $\theta$  variando-se de 10 a 70 ° com intervalo de 0,03 °. As medidas foram realizadas num difratômetro de raios-X X'Pert Pro da PANalytical (Figura 4.2), utilizando radiação à linha K $\alpha$  do cobre (1,5406 Å).



Figura 4.2 Equipamento utilizado na Difração de raios-X.

#### 4.1.2. Microscopia eletrônica de varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) é um importante e versátil método de caracterização da morfologia de materiais e amostras biológicas.

O princípio físico de funcionamento da SEM consiste na emissão de um feixe de elétrons (elétrodo negativo) por um filamento capilar de tungstênio mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 kV, que são acelerados em direção ao elétrodo positivo. A correção da direção do feixe, nesse percurso, é realizada por lentes condensadoras que alinham o feixe em direção à abertura da lente objetiva. A objetiva ajusta o foco do feixe antes dos elétrons atingirem a amostra que será analisada. A imagem é assim obtida pelo varrimento do feixe eletrônico incidente sobre a superfície da amostra. Depois da amplificação e processamento apropriados, um detetor de elétrons é responsável pela geração da imagem mostrando-a no visor. A SEM produz imagens de alta resolução, o que garante obter alta ampliação de detalhes (até 300.000 vezes) sem perda de nitidez. Com a SEM, é possível obter imagens tanto pelo padrão de difração de elétrons secundários (emitidos pelos átomos excitados pelo feixe de elétrons) como de elétrons retrodifundidos. Quando é utilizado o padrão de elétrons secundários, obtêm-se imagens da topografia da superfície, enquanto que o padrão de elétrons retrodifundidos, proporciona imagens com diferença de contraste de acordo com o elemento que está a ser analisado, por exemplo, elementos pesados como o ferro aparecem mais claros e elementos leves como o carbono aparecem mais escuros.



Neste trabalho, a SEM foi utilizada para analisar a morfologia das WO<sub>3</sub> NPs, dos substratos de papel e da *G. sulfurreducens*. As análises foram realizadas num microscópio eletrônico de varrimento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB (Figura 4.3).

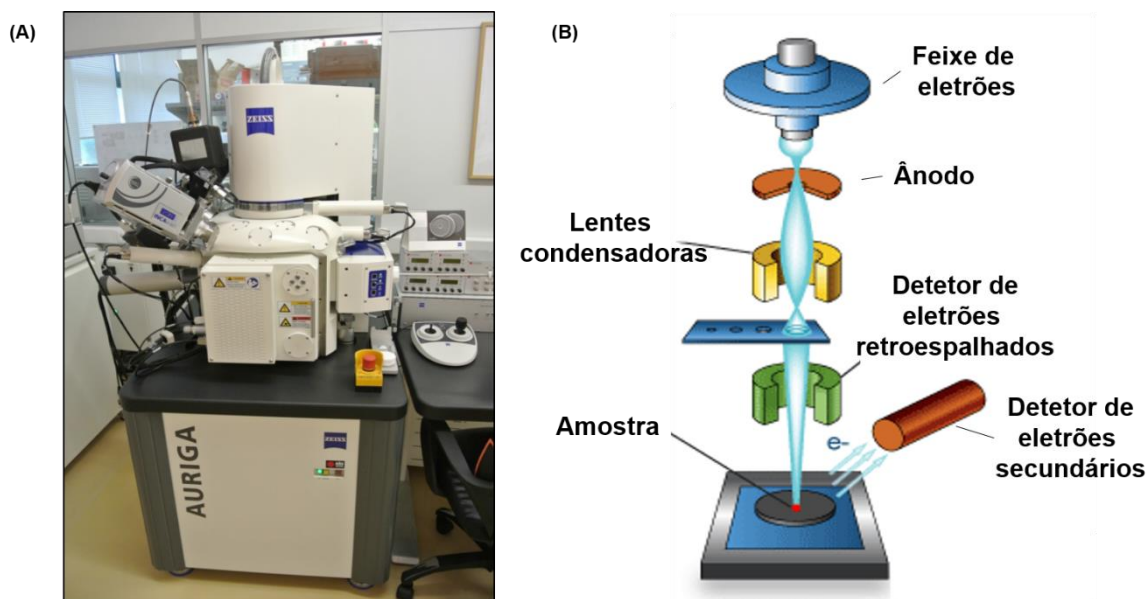


Figura 4.3 (A) Equipamento utilizado na Microscopia eletrônica de varrimento; (B) Representação esquemática de um equipamento de SEM.

#### 4.1.3. Espectroscopia dispersiva de raios-X

A espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS, do inglês *Energy Dispersive Spectroscopy*) é uma técnica analítica usada na caracterização química elementar de amostras e que geralmente é acoplado ao SEM. O seu funcionamento depende da interação da radiação de raios-X com um dado material. Uma vez que cada elemento químico possui uma estrutura atômica única a interação da radiação com a amostra origina picos característicos de cada elemento num espectro de intensidade (número de fótons registados) em função da energia dos raios-X.

Esta técnica está limitada à identificação de elementos de número atômico superior a  $Z = 5$  (boro). Os detetores podem ser ajustados de modo a passarem apenas uma gama de pulsos correspondentes ao pico de raios-X característico de um determinado elemento. O resultado permite produzir uma imagem elementar ou um mapa de raios-X da amostra, com a distribuição de cada elemento na amostra.

Os dados obtidos por EDS podem ser quantificados através do uso de padrões elementares apropriadas e recorrendo a algoritmos computacionais. Para a obtenção dos espectros EDS dos materiais estudados utilizou-se um detetor Oxford INCA xact com uma tensão de aceleração de 15 kV e abertura de diafragma de 60  $\mu\text{m}$  de modo a maximizar o sinal de raios-X emitidos pelas amostras.

## 4.2. Caracterização química

### 4.2.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com modo ATR

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é um tipo de espectroscopia de absorção que é usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. Esta análise baseia-se no facto de as ligações químicas possuírem frequências de vibração específicas as quais correspondem a níveis de energia bem definidos, chamados de níveis vibracionais. As vibrações moleculares podem ser divididas em dois tipos: vibração de deformação axial (*stretching*) e vibração de deformação angular (*bending*) (Figura 4.4 – B). As deformações axiais podem ser simétricas ou antissimétricas e são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos, e as deformações angulares envolvem mudanças dos ângulos entre o plano que contém a ligação e um plano de referência, podendo ser simétricas, antissimétricas ou simétricas e antissimétricas fora do plano. Quando um feixe de radiação infravermelha atravessa a amostra a radiação é absorvida pela molécula, causando alterações no estado vibracional das ligações covalentes, e a absorção é quantificada. Como esta alteração provoca alteração dos estados rotacionais circundantes, o espectro obtido é apresentado em forma de bandas. O espectro infravermelho pode ser apresentado em função da transmitância ou da absorvância da amostra.

Quando a amostra se revela inapropriada para medição da transmitância, por exemplo por ser opaca, pode ser utilizada uma configuração que permita medir a reflectância. No modo ATR (*Attenuated Total Reflection*) a interação entre o feixe e a amostra é realizada na interface entre a amostra e um cristal. O feixe infravermelho é direccionado através do cristal e, devido à alteração do índice de refração na sua superfície, o feixe é refletido para trás em vários pontos ao longo do comprimento do cristal, até finalmente sair para o detetor. Quando a amostra é colocada em contacto com a superfície do cristal, o feixe vai interagir com a amostra em diversos pontos.<sup>[41,68]</sup>

O aparelho utilizado foi o espectrofotómetro *Thermo Scientific* com acessório ATR de cristal de diamante (Figura 4.4 – A). Os espectros foram obtidos na gama de números de onda 520 a 4000 cm<sup>-1</sup>. Esta técnica foi utilizada para caracterizar as WO<sub>3</sub> NPs sintetizadas e os substratos de papel utilizados no desenvolvimento do sensor colorimétrico.

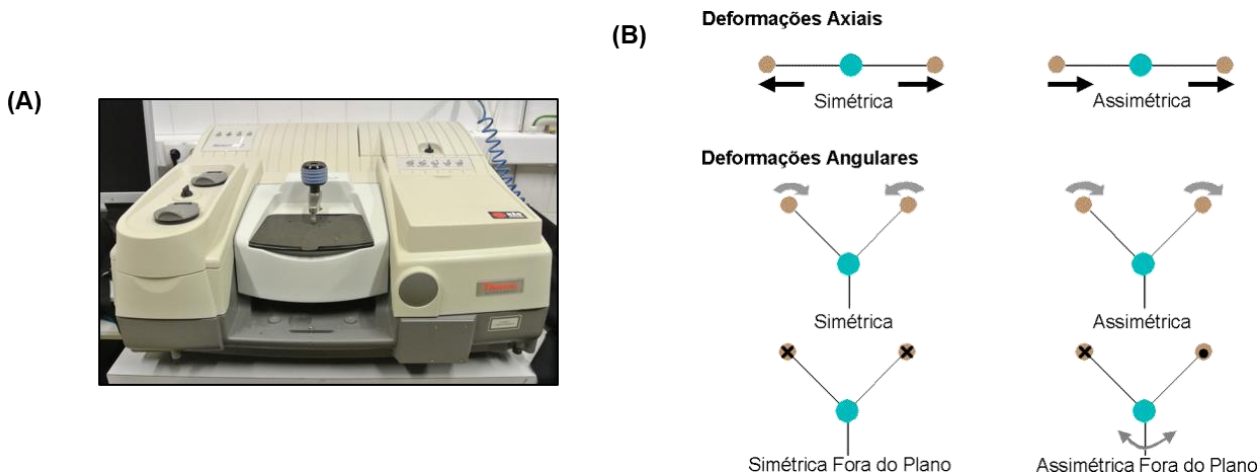


Figura 4.4 (A) Equipamento utilizado na Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; (B) Tipos de deformações.

### 4.3. Difusão dinâmica da luz

A difusão dinâmica de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) é uma técnica física que pode ser usada para determinar o tamanho de pequenas partículas em suspensão, ou de polímeros em solução.

Quando a luz atinge partículas de pequenas dimensões, é dispersa em todas as direções, desde que o tamanho das partículas seja inferior ao comprimento de onda do fóton incidente. Este fenómeno é chamado de dispersão de *Rayleigh*. A intensidade da luz dispersa varia ao longo do tempo, uma vez que, as partículas em suspensão se encontram em movimento (movimento Browniano), fazendo variar a distância entre os centros dispersores da luz. O tamanho das partículas pode ser determinado através da medição das mudanças na intensidade da luz dispersa ao longo do tempo (Figura 4.5 – B).

Esta técnica foi utilizada para determinar o tamanho das  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas. O equipamento utilizado foi o *AvidNano, W130i SABRe optics* (Figura 4.5 – A).

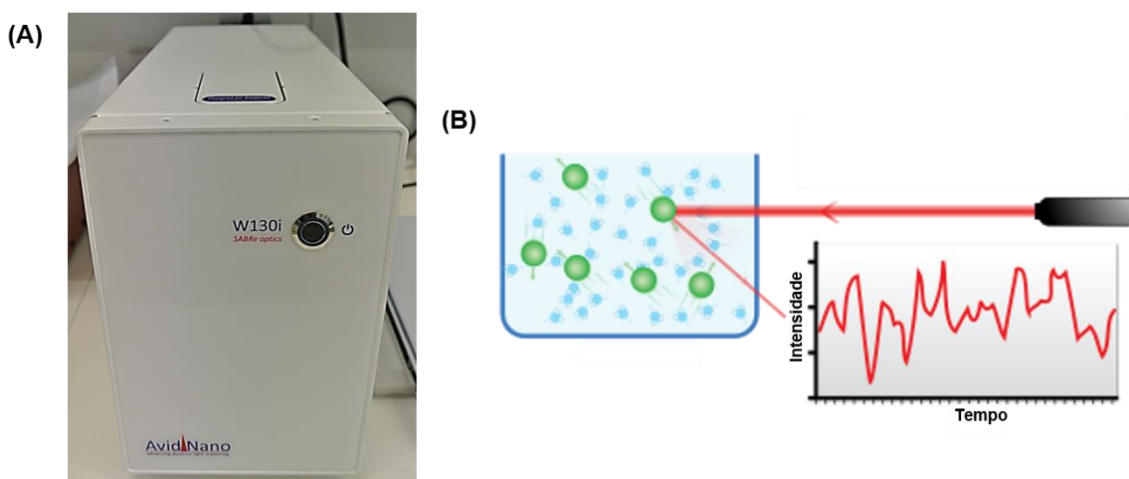


Figura 4.5 (A) Aparelho utilizado na técnica de Difusão dinâmica da luz; (B) Representação esquemática da medição da intensidade da luz dispersa ao longo do tempo.

#### 4.4. Ângulo de contacto

A interação entre uma superfície e um determinado líquido pode ser estudada através da medida do chamado ângulo de contacto  $\theta_c$ . Este é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado (Figura 4.6).

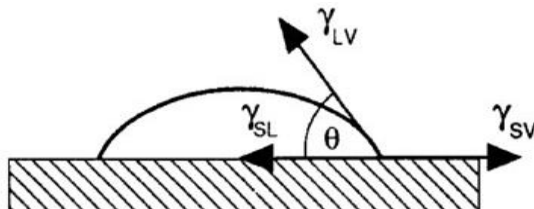


Figura 4.6 Esquema ilustrativo do comportamento de uma gota de líquido numa superfície.

A molhabilidade de uma superfície depende do equilíbrio termodinâmico entre um sistema de três interfaces: sólido, líquido e vapor. Assim, o ângulo de contacto representa uma medida quantitativa do processo de molhabilidade. Formalmente, o ângulo de contacto entre uma gota de um líquido com uma tensão superficial conhecida e uma superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas (que fariam a gota espalhar-se sobre a superfície) e as forças coesivas do líquido (que querem contrair a gota a uma esfera com uma superfície mínima). Se a gota repousar sobre uma superfície homogênea perfeitamente nivelada, forma-se um ângulo de contato de equilíbrio entre o líquido e a superfície sólida em qualquer ponto da linha de três fases, onde se encontram o sólido, o líquido e a fase de vapor. De acordo com o princípio da menor energia, a natureza tende sempre a um estado de mínima energia. É por esta razão, por exemplo, que uma gota de água tende à forma esférica, pois esta é a forma geométrica com a menor área superficial. Da mesma forma, a adesão de um material sobre outro será tanto melhor quando maiores forem as energias de superfícies envolvidas.

Considerando a gota em equilíbrio, tem-se a equação de *Young* (Equação 4.2), que pode ser derivada minimizando a energia mecânica do sistema para variações diferenciais das áreas de contacto das fases sólida, líquida e gasosa:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad (4.2)$$

onde  $\theta_c$  representa o ângulo de contacto,  $\gamma_{SV}$ ,  $\gamma_{SL}$  e  $\gamma_{LV}$  representam as tensões superficiais das interfaces sólido-vapor, sólido-líquido e líquido-vapor, respetivamente. Quando o ângulo de contacto se situa entre  $0^\circ < \theta_c < 90^\circ$ , diz-se que o líquido molha a superfície do sólido e o substrato é considerado hidrofílico. No caso de o ângulo se situar entre  $90^\circ < \theta_c < 180^\circ$  considera-se que o líquido não molha o sólido e o substrato é considerado hidrofóbico.

As propriedades hidrófobas dos substratos de papel foram determinadas através do equipamento OCA 20 da *Data Physics*, representado na Figura 4.7.

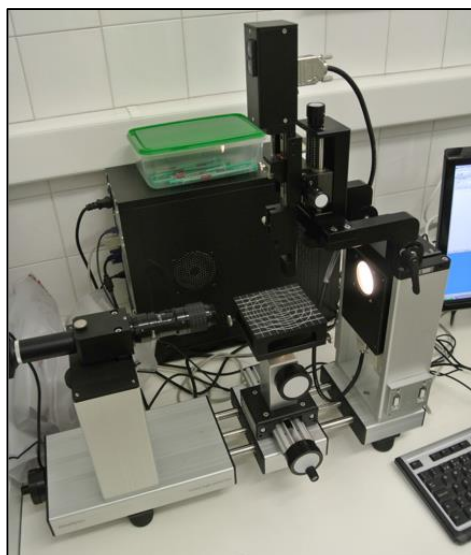


Figura 4.7 Equipamento utilizado na medição dos ângulos de contacto dos substratos de papel.

#### 4.5. Análise térmica

A análise térmica possibilita inferir sobre as alterações que um tratamento térmico pode provocar na massa da amostra, estimando-se, desta forma, as reações de decomposição e/ou degradação que podem ocorrer.

Neste trabalho, foram usadas em simultâneo as técnicas de termogravimetria e de calorimetria diferencial de varrimento, para caracterizar os substratos de papel utilizados. A análise térmica das amostras foi efetuada em atmosfera de ar e foram utilizados cadinhos de alumínio, no intervalo entre 20 °C e 550 °C com uma taxa de aquecimento de 5 K/min. O aparelho utilizado foi o *NETZSCH* (Figura 4.8).



Figura 4.8 Aparelho utilizado na análise térmica dos substratos de papel.

#### **4.5.1. Termogravimetria**

A termogravimetria (TG) é uma técnica de análise térmica na qual a variação da massa da amostra é determinada em função da temperatura ou do tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. O seu uso mais comum é na determinação de certas características da amostra que exibem perda ou ganho de massa devido a fenômenos de decomposição, oxidação ou perda de compostos voláteis. Representa uma técnica especialmente útil no estudo de materiais poliméricos incluindo as fibras de celulose.

#### **4.5.2. Calorimetria diferencial de varrimento**

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) é uma técnica termoanalítica onde a diferença entre a quantidade de calor necessária para aumentar a temperatura de uma amostra e da referência é medida em função da temperatura. Os calorímetros diferenciais de varrimento são constituídos por dois suportes de amostra, um para a amostra em estudo e outro para a referência (material inerte). A temperatura é medida continuamente e a técnica diferencial é usada para determinar o fluxo de calor da amostra, igualando os ganhos de calor entre a referência e a amostra. Com esta técnica é possível registrar variações como a temperatura de transição vítrea e a temperatura de início de degradação. Estas resultam em picos endotérmicos ou exotérmicos no gráfico de fluxo de calor em função da temperatura.

## 5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no decorrer deste trabalho assim como a sua discussão.

Inicialmente é apresentada a caracterização estrutural, morfológica e química das WO<sub>3</sub> NPs e de seguida os resultados estruturais, morfológicos, químicos e térmicos dos substratos de papel utilizados no desenvolvimento do sensor colorimétrico: papel de fotocópia e papel Whatman. O aumento da densidade celular, ao longo do processo de crescimento, da bactéria usada como EAB – *Geobacter sulfurreducens* – é acompanhado por espectroscopia UV-vis e a morfologia foi verificada por SEM.

Por último, são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios colorimétricos, em solução e em papel, com os sensores desenvolvidos na presença da bactéria *G. sulfurreducens*.

### 5.1. Caracterização das nanopartículas de WO<sub>3</sub> sintetizadas

No presente trabalho foi efetuado um estudo sobre a influência de alguns fatores na síntese hidrotermal das WO<sub>3</sub> NPs, sendo eles: o precursor, o agente direcional de estrutura (ADE) e o pH de síntese. As amostras obtidas foram caracterizadas por Difração de raios-X, Microscopia eletrónica de varrimento e Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

De modo a facilitar a identificação de cada amostra foi atribuída uma nomenclatura mais simples, que é apresentada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Nomenclatura das WO<sub>3</sub> NPs sintetizadas

Precursor	ADE	pH	Nomenclatura
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	NaCl	0,0	NC1
		0,4	NC2
		1,8	NC3
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0	NS1
		0,4	NS2
		1,8	NS3
PTA	-	0,0	PT1
		0,4	PT2
		1,8	PT3

### 5.1.1. Difração de raios-X

A técnica de DRX foi utilizada para determinar as estruturas cristalinas das amostras de  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas. Os difratogramas resultantes estão apresentados na Figura 5.1.

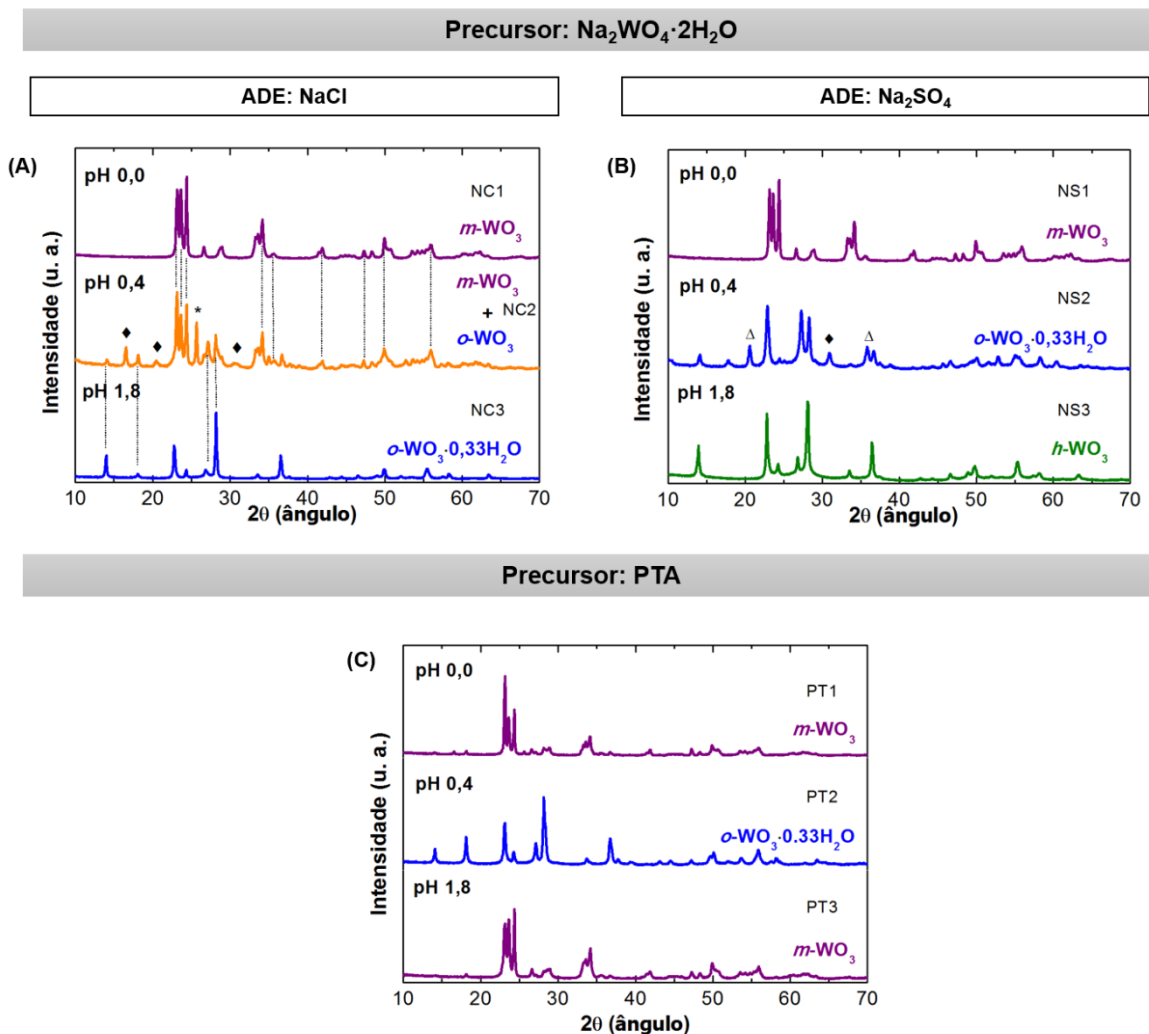


Figura 5.1 Difratogramas das  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas. (A)  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas a partir das soluções com  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaCl; (B)  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas a partir das soluções com  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; (C)  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas a partir das soluções com PTA. Os picos assinalados com \* e ♦ são característicos das estruturas cristalinas do precursor  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e do  $\text{H}_2\text{WO}_4$ , respetivamente. Os picos marcados com Δ não são identificáveis.

Pela análise dos difratogramas verifica-se que através da variação dos fatores mencionados anteriormente, foi possível obter-se com sucesso as três estruturas cristalográficas, mais comuns, do  $\text{WO}_3$ : monoclinica ( $m\text{-WO}_3$ ), ortorrômbica hidratada ( $\alpha\text{-WO}_3 \cdot 0.33\text{H}_2\text{O}$ ) e hexagonal ( $h\text{-WO}_3$ ). A identificação das estruturas cristalográficas foi feita com o auxílio do software *HighscorePlus*, *PANalytical*, por comparação com as fichas cristalográficas depositadas na base de dados do *International Centre for Diffraction Data* (ICDD) com as referências #00-043-1035, #01-072-0199 e #01-



075-2187, para as fases monoclinica, ortorrômbica e hexagonal, respetivamente e #01-084-0886 para o ácido túngstico (Anexo A).

É possível concluir que quando o  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  é usado como precursor com o NaCl como agente direcional de estrutura (ADE) (Figura 5.1 – A), as  $\text{WO}_3$  NPs crescem com uma estrutura cristalográfica monoclinica ( $m\text{-WO}_3$ ) a pH 0,0 (amostra NC1) e com uma estrutura ortorrômbica hidratada ( $o\text{-WO}_3 \cdot 0,33\text{H}_2\text{O}$ ) a pH 1,8 (amostra NC3). No caso da síntese a pH 0,4 (amostra NC2) obteve-se uma mistura das duas fases, monoclinica e ortorrômbica juntamente com o precursor (\*) e com o produto intermediário, ácido túngstico (♦), uma vez que, nestas condições experimentais a velocidade das reações envolvidas na formação das NPs ocorre mais lentamente, não ocorrendo a decomposição total do produto intermediário em  $\text{WO}_3$ .<sup>[62]</sup> Quando o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  é utilizado como ADE (Figura 5.1 – B), obtêm-se as estruturas cristalográficas monoclinica, ortorrômbica e hexagonal ( $h\text{-WO}_3$ ) para os valores de pH da síntese de 0,0 (amostra NS1), 0,4 (amostra NS2) e 1,8 (amostra NS3), respetivamente. É importante notar que a estrutura ortorrômbica obtida a pH 0,4 possui também um pico atribuído ao ácido túngstico (♦) e dois picos adicionais que não foi possível atribuir a nenhuma ficha da base de dados ICDD. O aparecimento destes dois picos está relacionado com distorções na rede cristalina da estrutura cristalográfica aquando do crescimento das NPs.<sup>[69]</sup> Finalmente, quando as sínteses são efetuadas com o PTA como precursor (Figura 5.1 – C), a estrutura cristalográfica das  $\text{WO}_3$  NPs varia de monoclinica, para os valores de pH mais baixo (amostra PT1) e mais alto (amostra PT3), a ortorrômbica para o pH intermédio (amostra PT2). Estes resultados demonstram a influência do precursor da reação e estão de acordo com resultados já publicados, embora possuam diferentes intensidades nos planos cristalográficos.<sup>[70]</sup>

A influência do pH é visível em todas as reações efetuadas, sendo que para o pH 0,0 obteve-se sempre a estrutura monoclinica independentemente do precursor utilizado. A um pH intermédio (0,4), a estrutura cristalina  $o\text{-WO}_3 \cdot 0,33\text{H}_2\text{O}$  prevalece ainda que a uma velocidade de reação reduzida para o caso do precursor  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Nesta condição ocorre ainda uma mistura de fases e a presença de impurezas/reagentes precursores. As maiores diferenças em termos de estrutura cristalográfica ocorrem ao pH mais elevado (1,8) já que se obtiveram as três estruturas cristalinas do  $\text{WO}_3$ , dependendo do precursor e ADE. Conclui-se assim, que com o aumento do pH, ou seja, diminuição de protões, o efeito dos reagentes sobrepõe-se ao do pH.

Os ADE atuam como *capping agents* controlando cineticamente a taxa de crescimento de diferentes faces do cristal através da absorção e desabsorção seletiva às mesmas. Quando os iões são adicionados ao processo de síntese estes ficam absorvidos na superfície de algumas das faces, levando a um crescimento mais lento das mesmas e permitindo o crescimento mais acelerado das outras. No caso dos iões sulfato, foi reportado anteriormente<sup>[61,66,71,72]</sup> que a absorção seletiva às faces resulta num crescimento mais rápido apenas numa direção (estrutura unidimensional) dando origem à geometria hexagonal em forma de agulha, sendo que os iões positivos de sódio funcionam como estabilizadores no processo de crescimento. No caso dos iões cloreto, ainda não se encontra totalmente comprovado qual o efeito no crescimento das NPs mas prevê-se que seja similar ao dos iões sulfato.

Os parâmetros de rede das amostras obtidas foram também calculados e estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Parâmetros de célula das nove amostras de WO<sub>3</sub> NPs.

Amostra	Constantes da célula, Å			Ângulo, °		
	a	b	c	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
NC1	7,30	7,53	10,50	90,00	133,04	90,00
NC2	7,92	7,55	10,49	90,00	132,96	90,00
NC3	7,32	12,52	7,73	90,00	90,00	90,00
NS1	7,30	7,52	10,51	90,00	133,07	90,00
NS2	7,31	12,52	7,51	90,00	90,00	90,00
NS3	7,32	7,32	3,90	90,00	90,00	119,00
PT1	7,63	7,29	10,54	90,00	141,53	90,00
PT2	7,36	12,51	7,70	90,00	90,00	90,00
PT3	7,30	7,53	10,51	90,00	133,07	90,00

Os valores estão de acordo com os característicos para as estruturas cristalográficas em questão (Anexo A).

Adicionalmente, foram também preparadas as imagens das três estruturas cristalográficas obtidas, com o auxílio do software *CrystalMaker* (Figura 5.2).

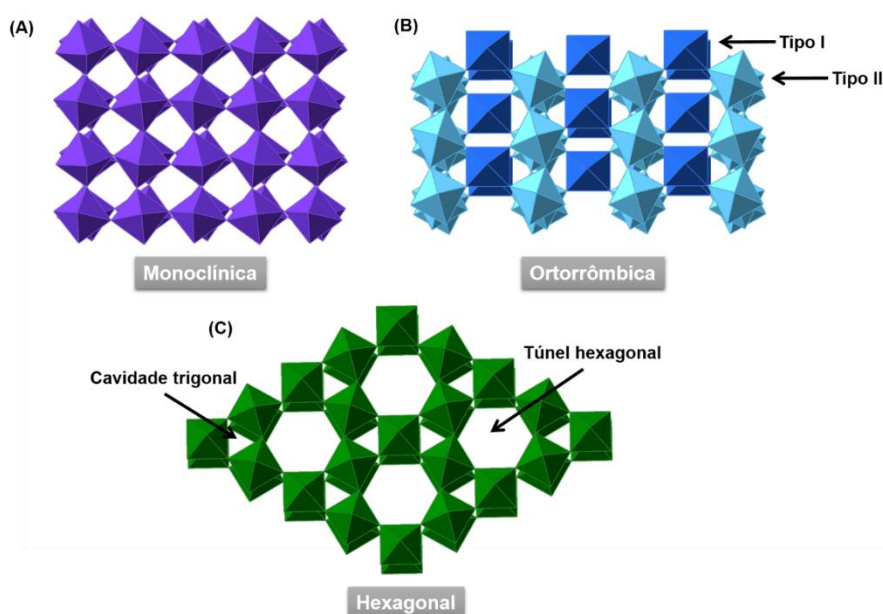


Figura 5.2 Imagens das estruturas cristalográficas obtidas na síntese das WO<sub>3</sub> NPs. (A) Estrutura cristalográfica monoclinica; (B) Estrutura cristalográfica ortorrômbica com os dois tipos de ligação – tipo I e tipo II; (C) Estrutura cristalográfica hexagonal onde são evidenciados os túneis hexagonais e as cavidades trigonais.

Estas imagens evidenciam as diferenças na geometria das três estruturas cristalográficas. A estrutura monoclinica e a estrutura ortorrômbica hidratada apresentam uma geometria mais compacta em relação à estrutura hexagonal. A geometria monoclinica (Figura 5.2 – A) possui uma estrutura clássica do tipo ReO<sub>3</sub> com partilha dos cantos dos octaedros de WO<sub>6</sub> conectado nas três direções espaciais.<sup>[62]</sup> O elemento estrutural básico da geometria ortorrômbica hidratada (Figura 5.2 – B) consiste num plano infinito de octaedros de WO<sub>6</sub> que partilham os seus cantos formando anéis de seis membros

ao longo do plano (001), em duas direções espaciais. Cada plano (001) é composto por dois tipos de octaedros de  $\text{WO}_6$ : tipo I e tipo II. O tipo I consiste em seis átomos de oxigénio que rodeiam o átomo central de tungsténio, conectando seis octaedros diferentes pela partilha dos seus cantos. Os quatro átomos de oxigénio no plano (001) são partilhados por quatro octaedros vizinhos na mesma camada, enquanto que os outros dois átomos de oxigénio, que estão no plano perpendicular ao plano (001), são partilhados com as camadas adjacentes que estão acima e abaixo da camada do plano (001). Isto garante a ligação entre as várias camadas e, consequentemente a estabilidade da estrutura ortorrômbica hidratada. O tipo II consiste em quatro átomos de oxigénio no plano (001), e os outros dois átomos de oxigénio fora do plano são substituídos pelas ligações terminais  $\text{W}=\text{O}$  e  $\text{W}-\text{OH}_2$ , dando origem a octaedros de  $\text{WO}_5(\text{H}_2\text{O})$ . Semelhante aos octaedros de tipo I, os quatro átomos de oxigénio dos octaedros de tipo II no plano (001) são partilhados por quatro octaedros vizinhos na mesma camada, mas os dois átomos de oxigénio fora do plano (001) são impossíveis de se ligarem a outros átomos de tungsténio das camadas adjacentes acima e abaixo. Como resultado, uma camada infinita é formada pela partilha dos cantos dos octaedros de tipo I e II no plano (001). Portanto, a estrutura ortorrômbica hidratada provém do empilhamento destas camadas na direção [001]. Esta disposição resulta em interações fortes entre camadas e em interações mais fracas entre as camadas adjacentes.<sup>[62]</sup> A geometria hexagonal (Figura 5.2 – C) pode ser descrita por octaedros de  $\text{WO}_6$  com cada átomo de oxigénio a ser partilhado com outro octaedro. Esta estrutura hexagonal é constituída por octaedros de  $\text{WO}_6$  ligeiramente distorcidos organizados em anéis de seis membros que crescem numa única direção espacial. O empilhamento das camadas leva à formação de túneis e cavidades em forma de triângulo que se formam entre os octaedros de  $\text{WO}_6$ .<sup>[62]</sup> A estrutura hexagonal tem atraído grande atenção no seio da comunidade científica e tem sido alvo de vários estudos devido à sua estrutura cristalográfica em túnel que facilita a intercalação de iões positivos como  $\text{H}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^+$ , etc. para produzir os bronzes de  $\text{WO}_3$ , dentro da estrutura do  $\text{WO}_3$ .<sup>[66,72]</sup>

### 5.1.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de FTIR foi utilizada para complementar a análise das WO<sub>3</sub> NPs sintetizadas. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 5.3.

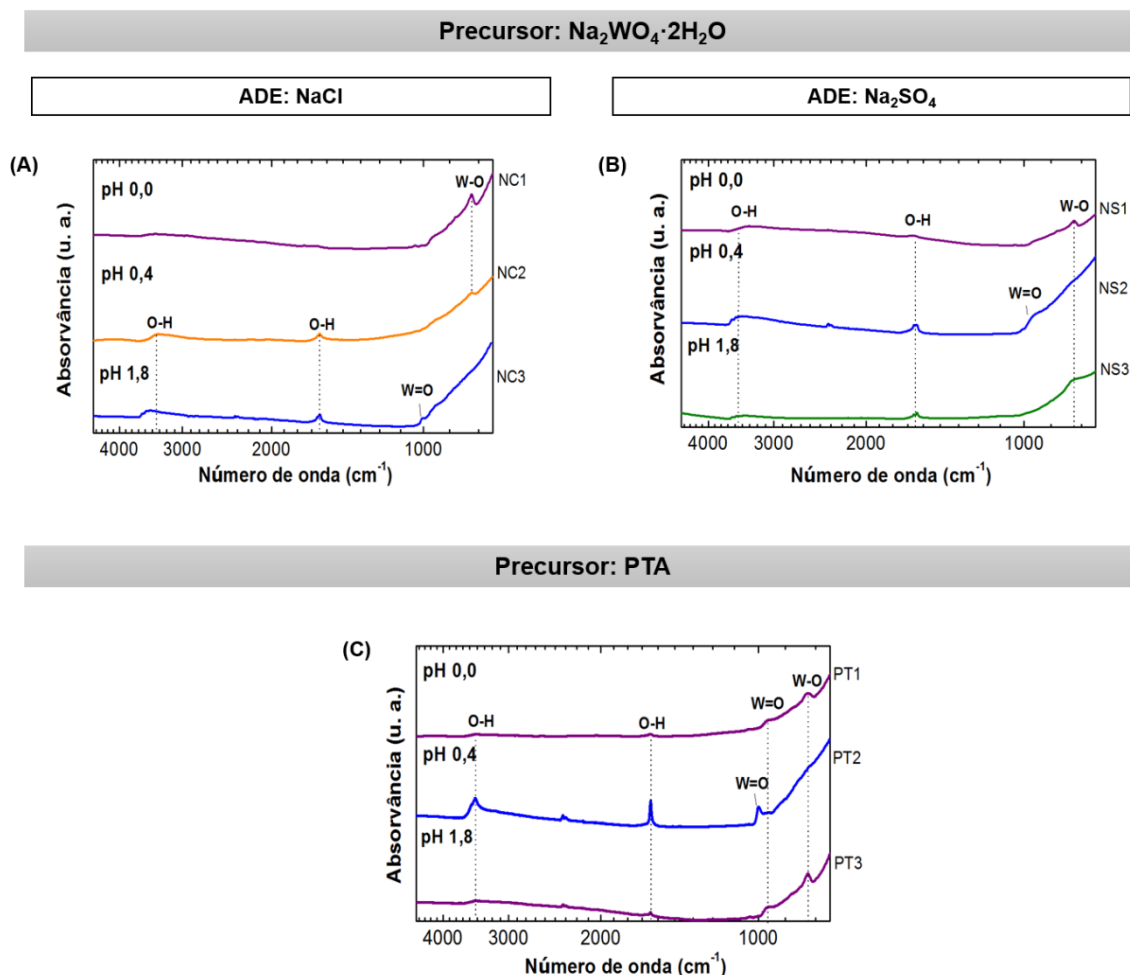


Figura 5.3 Espectros de FTIR das WO<sub>3</sub> NPs sintetizadas. (A) WO<sub>3</sub>NPs sintetizadas a partir das soluções com Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, NaCl; (B) WO<sub>3</sub>NPs sintetizadas a partir das soluções com Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (C) WO<sub>3</sub>NPs sintetizadas a partir das soluções com PTA. As cores dos espectros estão relacionadas com a geometria das nanopartículas determinada por DRX: roxo – *m*-WO<sub>3</sub>; laranja – mistura de *m*-WO<sub>3</sub> e *o*-WO<sub>3</sub>·0,33H<sub>2</sub>O; azul – *o*-WO<sub>3</sub>·0,33H<sub>2</sub>O e verde – *h*-WO<sub>3</sub>.

A banda observada a ~800 cm<sup>-1</sup>, atribuída ao estiramento das ligações W-O, característica do WO<sub>3</sub> é verificada em todas as amostras, sendo que na estrutura ortorrômbica não é totalmente visível devido ao ruído de fundo superior para baixos números de onda.

A distinção das estruturas cristalográficas ocorre pela presença da banda a ~1000 cm<sup>-1</sup> correspondente à deformação das ligações W=O (tipo II), a ~1600 cm<sup>-1</sup> atribuído às vibrações dos grupos hidroxila (OH) e entre ~3000-3500 cm<sup>-1</sup> atribuído ao alongamento das ligações do mesmo grupo, típicas para a estrutura ortorrômbica hidratada.

Neste trabalho, verificou-se que as amostras NS1, PT1 e PT3 correspondentes ao  $m\text{-WO}_3$  e NS3 correspondente ao  $h\text{-WO}_3$  também demonstram a presença de grupos hidroxilo o que pode ser justificado pela presença de água adsorvida à superfície das NPs. No caso das amostras PT1 e PT3 verificou-se também a presença de grupos  $\text{W}=\text{O}$ , o que não foi identificado no difratograma de XRD. Embora em pequena quantidade, estas bandas podem ser devido à presença de precursor na amostra ou a algum produto secundário não identificado.

### 5.1.3. Microscopia eletrônica de varrimento

A morfologia superficial das amostras sintetizadas foi caracterizada por microscopia eletrônica de varrimento e encontra-se apresentada na Figura 5.4.

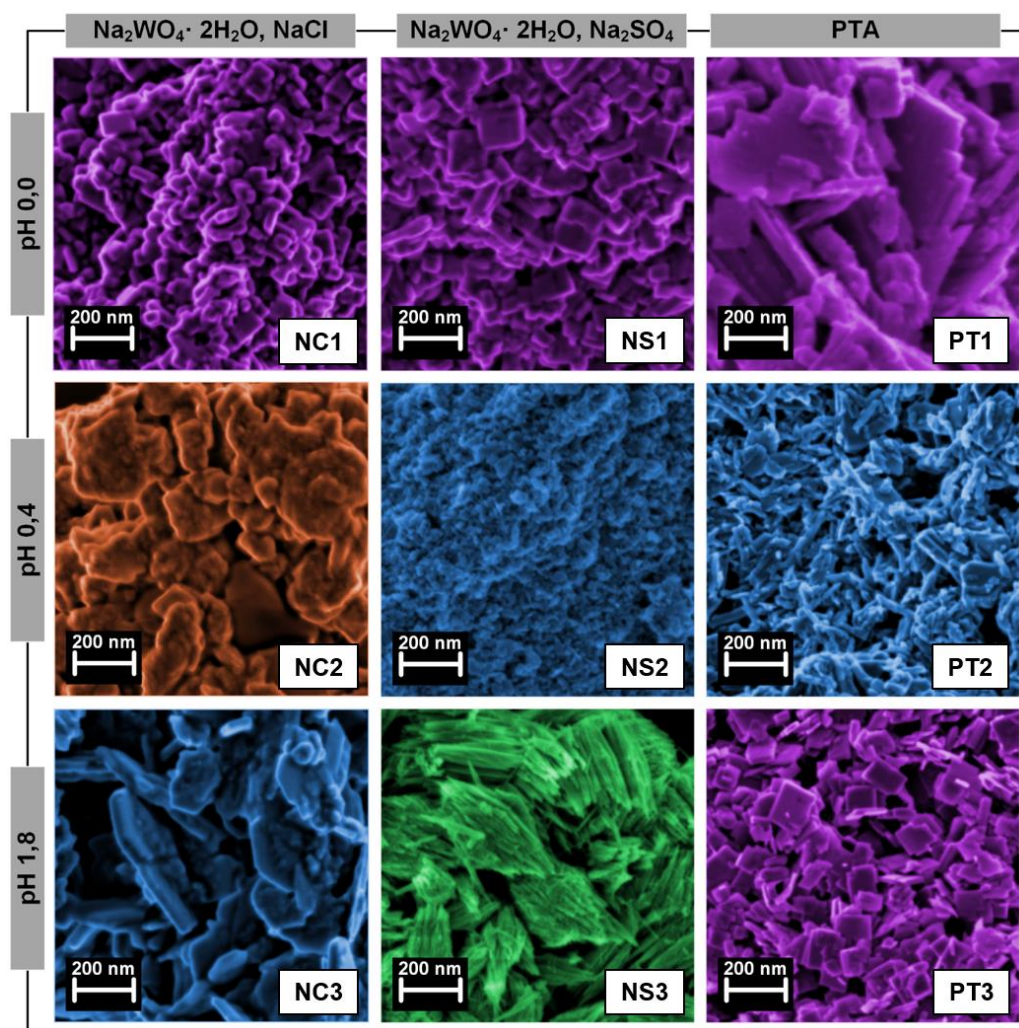


Figura 5.4 Imagens de SEM das amostras de  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas. As cores das imagens SEM estão relacionadas com a geometria das nanopartículas determinada por DRX: roxo –  $m\text{-WO}_3$ ; laranja – mistura de  $m\text{-WO}_3$  e  $o\text{-WO}_3 \cdot 0,33\text{H}_2\text{O}$ ; azul –  $o\text{-WO}_3 \cdot 0,33\text{H}_2\text{O}$  e verde –  $h\text{-WO}_3$ .

Os resultados mostram que as  $\text{WO}_3$  NPs obtidas a partir do precursor  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  apresentam diferentes morfologias: nanocubos com a geometria monoclinica, nanofolhas com a geometria ortorrômbica, nanofios com a hexagonal e estruturas desorganizadas compostas por mistura de fases

e/ou presença de impurezas. As WO<sub>3</sub> NPs derivadas do PTA apresentam arestas com maior definição sendo nanofolhas a pH 0,0, uma mistura de nanoagulhas e nanocubos a pH 0,4 e nanocubos a pH 1,8. Estes resultados confirmam, que a síntese das nanopartículas de WO<sub>3</sub> são sensíveis ao precursor, ao ADE assim como ao pH da síntese, especialmente a pH 1,8, o que é comprovado pelas diferentes estruturas cristalográficas e morfológicas dos produtos finais.

De todas as morfologias obtidas, o facto de os nanofios serem uma estrutura unidimensional, ou seja, com uma dimensão elevada num dos eixos, confere-lhe características novas e otimizadas em termos de área superficial e propriedades físicas tais como, características óticas, magnéticas e eletrónicas.

Foi também determinado o tamanho das WO<sub>3</sub> NPs por DLS (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3 Determinação do tamanho das WO<sub>3</sub> NPs sintetizadas.**

<b>Amostra</b>	<b>Tamanho (nm)</b>
<b>NC1</b>	158,32 ± 59,11
<b>NC2</b>	183,11 ± 71,45
<b>NC3</b>	247,49 ± 41,80
<b>NS1</b>	179,82 ± 66,74
<b>NS2</b>	139,59 ± 61,73
<b>NS3</b>	222,57 ± 20,62
<b>PT1</b>	492,23 ± 86,02
<b>PT2</b>	124,71 ± 21,00
<b>PT3</b>	120,31 ± 18,16



## 5.2. Caracterização dos substratos de papel

No presente trabalho, foi feita a caracterização dos substratos de papel utilizados no desenvolvimento do sensor de papel: papel de fotocópia e papel Whatman nº 1 (Figura 5.5). Uma vez que estes papéis são usados neste trabalho como suporte para os ensaios colorimétricos é importante obter informações sobre as suas propriedades estruturais, químicas, morfológicas, e térmicas.

As técnicas usadas foram: Difração de raios-X, Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, Microscopia eletrônica de varrimento com Espectroscopia dispersiva de raios-X, medição do Ângulo de contacto, Termogravimetria e Calorimetria diferencial de varrimento.

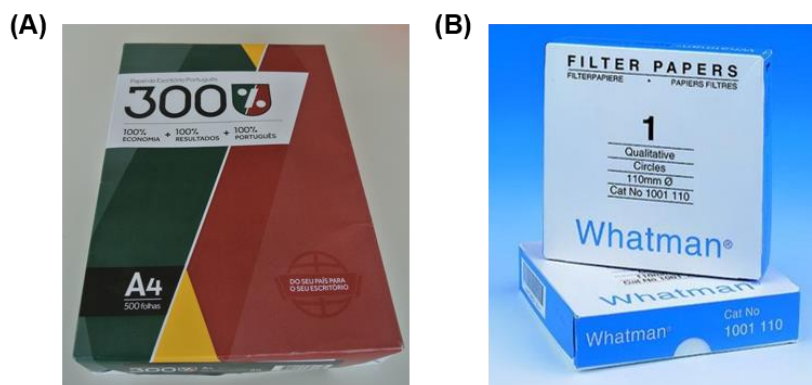


Figura 5.5 Papéis utilizados no desenvolvimento do sensor de papel. (A) Papel de fotocópia 300 % da Soporcel; (B) Papel Whatman.

Adicionalmente, é também importante conhecer algumas propriedades macroscópicas dos papéis em questão, de forma a evidenciar as diferenças entre os mesmos. Na Tabela 5.4 encontram-se algumas destas propriedades macroscópicas.

Tabela 5.4 Propriedades macroscópicas do papel de fotocópia e do papel Whatman.<sup>[41,61]</sup>

Propriedade macroscópica	Papel de fotocópia	Papel Whatman nº 1
Gramagem, g/m <sup>2</sup>	81,3	88,0
Espessura, µm	102	180
Densidade, Kg/m <sup>3</sup>	797	489
Porosidade, %	49	68

**Nota:** as informações relativas ao papel de fotocópia foram gentilmente cedidas pela Portucel, Soporcel.

A densidade é obtida a partir da razão entre a gramagem e a espessura do papel. Conhecendo a densidade do papel é possível fazer uma estimativa da sua porosidade relacionando a densidade das fibras de celulose ( $\rho_{\text{fibra}} = 1540 \text{ kg/m}^3$ ) com a densidade do papel, segundo a Equação 5.1<sup>[41]</sup>:

$$\text{Porosidade (\%)} = \left(1 - \frac{\rho_{\text{papel}}}{\rho_{\text{fibras}}}\right) \times 100 \quad (5.1)$$

A porosidade do papel provém dos espaços entre as fibras, dos lumens das fibras que não colapsaram no processo de fabrico do papel e da porosidade intrínseca das paredes das fibras. Quanto

maior for a densidade do papel menos espaços existem entre as suas fibras e, conseqüentemente menor será a sua porosidade.<sup>[41,68]</sup> Como se pode observar na Tabela 5.5, o papel de fotocópia tem maior densidade o que resulta numa menor porosidade, quando comparado com o papel Whatman. No entanto, como foi dito anteriormente e será comprovado posteriormente, durante o processo de fabrico do papel de fotocópia são utilizados aditivos para melhorar algumas das suas propriedades. A adição destes componentes adicionais faz com que a densidade do papel de fotocópia aumente, fazendo com que a determinação da porosidade do papel seja bastante relativa uma vez que não é possível ter só em conta as fibras de celulose.

A posterior caracterização irá assim ajudar a obter uma melhor compreensão sobre as características e propriedades destes papéis.

### 5.2.1. Difração de raios-X

A análise estrutural do papel de fotocópia e do papel Whatman foi feita por Difração de raios-X e os difratogramas obtidos, assim como a atribuição das estruturas cristalinas identificadas é apresentado na Figura 5.6.

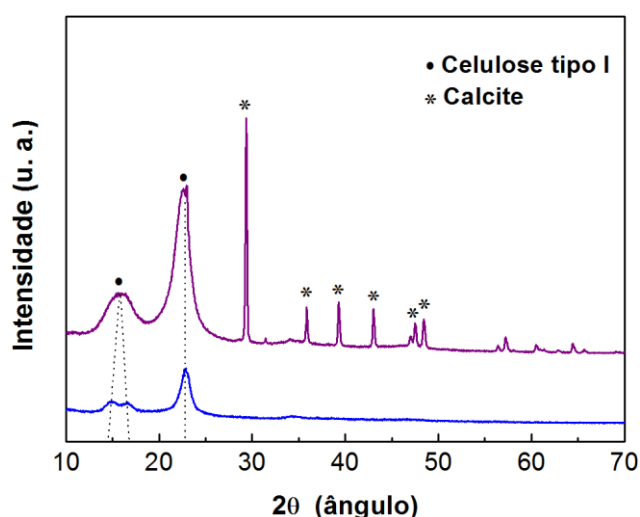


Figura 5.6 Difratogramas do papel de fotocópia (a roxo) e do papel Whatman (a azul).

Pela análise dos difratogramas é possível observar que ambos os papéis possuem os picos característicos da celulose de tipo I (ICDD #00-056-1718719). No caso do difratograma do papel Whatman (a azul) verifica-se a existência de dois picos a 14,88 e 16,63 ° o que, no caso do difratograma do papel de fotocópia (a roxo) não acontece, existindo apenas um pico largo 15,90 °. Isto deve-se ao facto de o papel de fotocópia possuir quantidades residuais de materiais amorfos, como a hemicelulose e a lenhina, nas fibras de celulose, o que é comprovado pela fusão dos dois picos. A celulose de tipo I possui uma geometria monoclinica, com constantes da célula unitária de  $a = 8,3$ ,  $b = 10,3$ ,  $c = 7,9$  Å e ângulos  $\alpha = 90$ ,  $\beta = 84$  e  $\gamma = 90$  °.

O Índice de Cristalinidade ( $I_{cr}$ ) dos substratos de papel pode ser calculado a partir da intensidade máxima do plano (002) da estrutura cristalina da celulose de tipo I (pico a 22,90 °), usando o método empírico de Segal, através da Equação 5.2:



$$I_{Cr} = \frac{I_{(002)} - I_{(am)}}{I_{(002)}} \times 100 \quad (5.2)$$

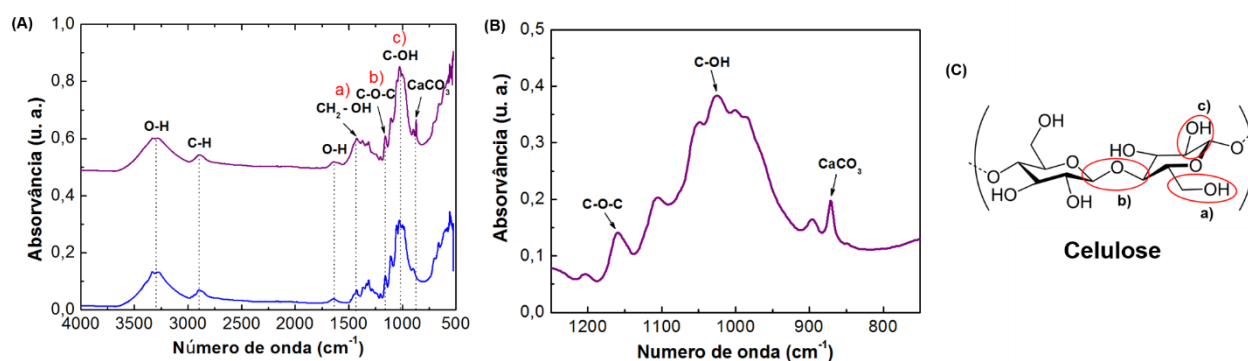
onde  $I_{(am)}$  representa a intensidade de difração da componente amorfa, que corresponde a  $2\theta = 18^\circ$ .<sup>[75]</sup>

Como era de esperar verificou-se que o papel de fotocópia possui um índice de cristalinidade inferior (77,96 %) ao do papel Whatman (86,01 %), o que corrobora o que foi dito anteriormente.

Pela análise do difratograma do papel de fotocópia é possível identificar outra estrutura cristalina que não está presente no papel Whatman – a calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) (ICDD #01-072-1937), que possui uma geometria romboédrica, com os parâmetros de rede  $a = b = 4,99$  e  $c = 17,08$  Å e  $\alpha = 90$ ,  $\beta = 90$  e  $\gamma = 120^\circ$ . Este composto constitui o principal aditivo usado no processo de fabrico de papel de fotocópia e representa cerca de 20 % da constituição do papel. O mesmo é usado na alteração das propriedades óticas do papel, formando aglomerados porosos que conferem opacidade e brilho ao papel, e melhoram a capacidade de receção de tinta, pelo que é mais utilizado em substratos destinados a escrita e impressão.<sup>[41,68]</sup> Estes resultados estão de acordo com a informação fornecida pela Soporcel para este tipo de papel conforme apresentado anteriormente na Tabela 5.4.

### 5.2.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A técnica de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi utilizada com o objetivo de confirmar a presença das ligações químicas dos compostos identificados por Difração de raios-X. Os espectros de FTIR do papel de fotocópia e do papel Whatman encontram-se na Figura 5.7 - A.



**Figura 5.7** Análise química dos substratos de papel. (A) Espectros de FTIR do papel de fotocópia (roxo) e do papel Whatman (azul); (B) Ampliação da região de impressão digital do espectro de FTIR do papel de fotocópia; (C) Estrutura química do polímero celulose.

Em ambos os espectros é possível identificar os picos de celulose, especialmente no intervalo de  $1500 - 900 \text{ cm}^{-1}$ , chamada de região de impressão digital. Desta região fazem parte os picos característicos da deformação assimétrica das ligações  $\text{CH}_2\text{-OH}$  dos grupos hidroxilo (Figura 5.7 – C – a)),  $\text{C-O-C}$  das ligações  $\beta$ -glicosídeas (Figura 5.7 – C – b)), assim como das ligações  $\text{C-OH}$  (Figura 5.7 – C – c)). A banda a  $3000 \text{ cm}^{-1}$  e o pico a  $1600 \text{ cm}^{-1}$  correspondem às vibrações OH das moléculas de água absorvidas nas fibras de celulose. Além disto, é possível também identificar o pico característico das ligações  $\text{C-H}$  a  $2909 \text{ cm}^{-1}$ , presentes na celulose.<sup>[41,68,75–78]</sup>

Como era expectável o composto  $\text{CaCO}_3$  é encontrado apenas no espectro do papel de fotocópia através da identificação do pico a  $870\text{ cm}^{-1}$ . Além deste pico, o  $\text{CaCO}_3$  possui também uma banda característica a  $1415\text{ cm}^{-1}$ . Contudo, a identificação desta banda no espectro do papel de fotocópia não é possível uma vez que se encontram também nesta zona ligações características da celulose que mascaram a presença do composto.<sup>[41,68,76,78]</sup> No entanto, o pico a  $870\text{ cm}^{-1}$  (Figura 5.7 – B) e a presença desta estrutura cristalina no difratograma do papel de fotocópia (Figura 5.6) não deixam dúvidas acerca da presença deste composto na constituição do papel.

A ausência de bandas na região entre  $1750 - 1500\text{ cm}^{-1}$ , característica das hemiceluloses e lenhinas<sup>[41,76]</sup>, indica que nenhum dos papéis apresentam estes componentes na sua constituição, o que está de acordo com os elevados índices de cristalinidade calculados para ambos os papéis, confirmando assim que as fibras de celulose têm pouca quantidade de materiais amorfos na sua constituição. Este resultado já era esperado no caso do papel Whatman visto que a fonte de fibras de celulose utilizada no seu processo de fabrico é o algodão, que não contém hemicelulose e lenhina, ao contrário da madeira usada como fonte de fibras de celulose na produção do papel de fotocópia. No entanto, durante o fabrico do papel que usa a madeira como fonte de celulose são utilizados processos químicos para eliminar os materiais amorfos o que justifica a ausência dos mesmos no papel de fotocópia.

Verifica-se também que o espectro do papel Whatman é idêntico ao espectro da celulose<sup>[41]</sup> o que indica que este material é constituído maioritariamente por celulose, sem aditivos.

### 5.2.3. Microscopia eletrónica de varrimento

A caracterização por microscopia eletrónica de varrimento tem como objetivo observar detalhadamente a morfologia superficial dos substratos de papel utilizados como suporte no desenvolvimento do sensor de papel. As imagens de SEM do papel de fotocópia e do papel Whatman encontram-se na Figura 5.8.

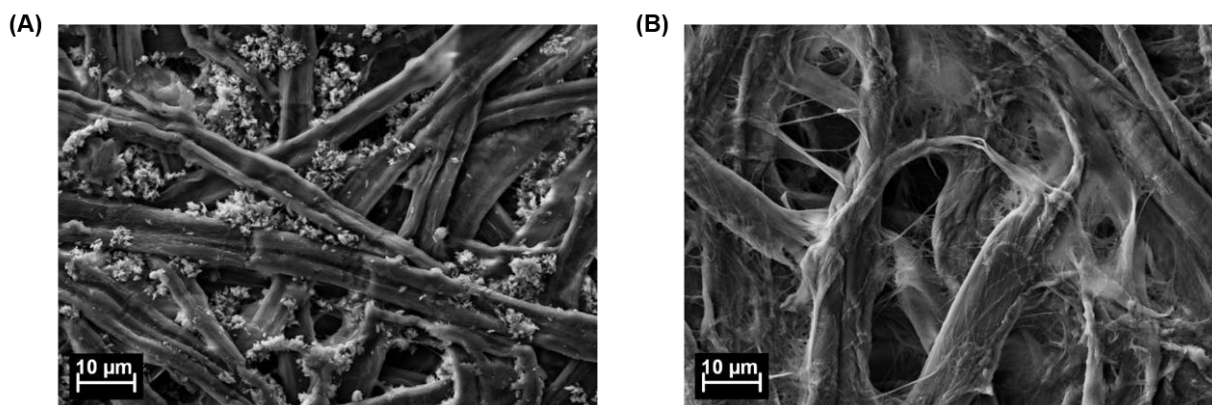


Figura 5.8 Morfologia dos substratos de papel utilizados. (A) Imagem SEM do papel de fotocópia; (B) Imagem SEM do papel Whatman.

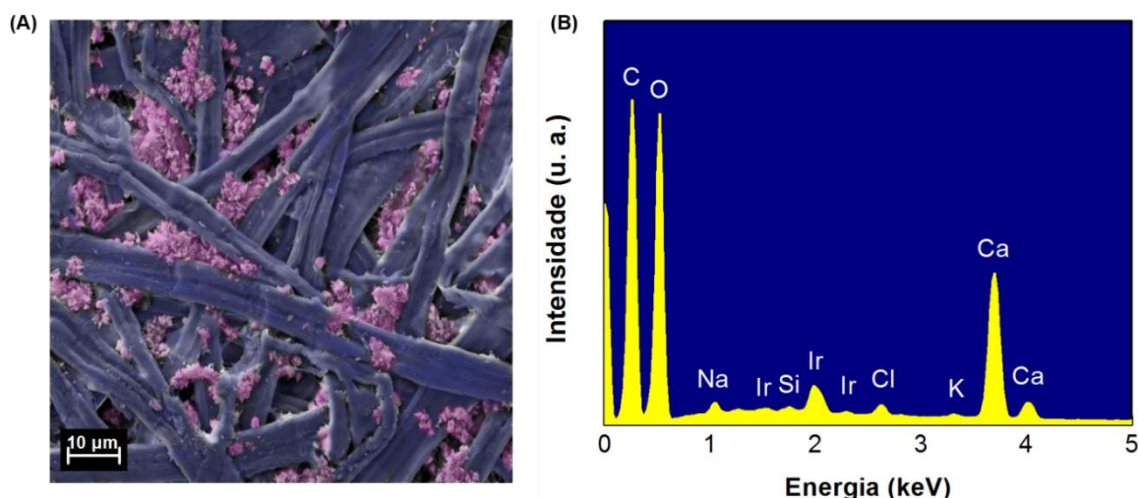
Analisando as imagens SEM é possível observar que, como era de esperar, existem diferenças na morfologia dos dois substratos de papel. Embora ambas sejam maioritariamente constituídas por uma rede tridimensional de fibras de celulose entrelaçadas, é possível observar na imagem SEM do papel de

fotocópia a presença de aglomerados cristalinos que correspondem ao  $\text{CaCO}_3$  já identificado pelas técnicas precedentes.

Comparando as imagens SEM dos dois substratos de papel é possível observar que as fibras de celulose no papel de fotocópia são mais achatadas ao contrário das do papel Whatman que têm uma geometria mais cilíndrica, o que contribui para a maior espessura do papel. Além disso, verifica-se também que o papel Whatman é mais poroso e que o papel de fotocópia possui uma maior densidade de fibras o que já tinha sido determinado nas propriedades macroscópicas. A elevada densidade de fibras do papel de fotocópia e o revestimento originam um papel menos poroso e com uma superfície mais uniforme, o que é ideal para a escrita e impressão.

#### 5.2.4. Espectroscopia dispersiva de raios-X

De forma a consolidar os conhecimentos obtidos pelas técnicas anteriores e para confirmar que os aglomerados observados nas imagens SEM do papel de fotocópia são efetivamente constituídos por  $\text{CaCO}_3$ , foi feita também uma análise elementar por Espectroscopia dispersiva de raios-X, que permite identificar os elementos químicos presentes na amostra. Na figura seguinte está representado a imagem SEM do papel de fotocópia (Figura 5.9 – A) e o espectro cumulativo da análise EDS efetuado ao mesmo (Figura 5.9 – B).



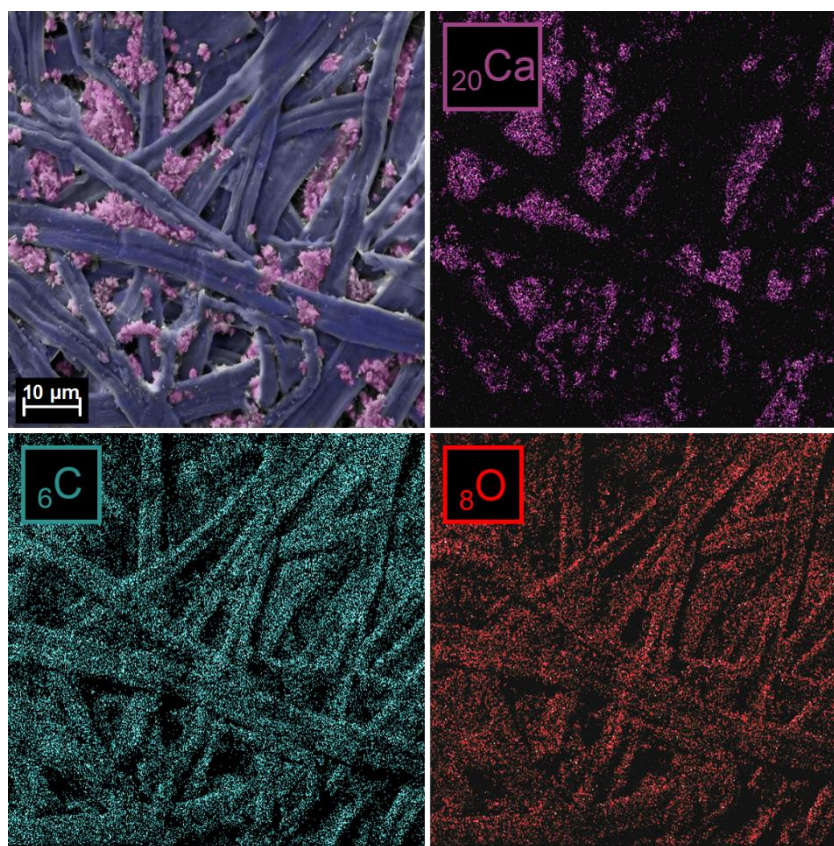
**Figura 5.9** Análise EDS do papel de fotocópia. (A) Imagem SEM à qual a análise foi feita; (B) Espectro cumulativo da análise EDS ao papel de fotocópia. A imagem SEM foi colorida artificialmente para uma maior distinção entre os diferentes constituintes.

No espectro EDS podem observar-se os picos correspondentes ao carbono ( $E = 0,26$  keV), ao oxigénio ( $E = 0,52$  keV) e ao cálcio ( $E = 3,7$  e  $4,0$  keV). Como era de esperar os picos referentes ao carbono e ao oxigénio são os que possuem maiores intensidades uma vez que são os constituintes do componente em maior quantidade no papel, a celulose. A existência dos picos característicos do cálcio, juntamente com o do carbono confirma mais uma vez que os aglomerados observáveis nas imagens SEM se referem ao  $\text{CaCO}_3$ . Além disso foram ainda detetados outros elementos em quantidades

residuais, nomeadamente o sódio ( $E = 1,04$  keV), o irídio ( $E = 1,52, 1,90$  e  $2,29$  keV), o silício ( $E = 1,75$  keV), o cloro ( $2,62$  keV) e o potássio ( $3,32$  keV). O irídio é referente à camada de revestimento utilizada na amostra de papel (espessura de  $10$  nm) de modo a tornar possível a observação do mesmo por SEM, e o silício é o principal constituinte do suporte utilizado nesta técnica.

É importante referir que a análise EDS utilizada sozinha não é capaz de fornecer toda a informação necessária para identificar os compostos de uma amostra uma vez que apenas deteta os elementos relativos. Ao complementar esta técnica com outras é assim possível ter uma informação bastante segura sobre os constituintes de uma amostra.

Além do espectro cumulativo, a análise EDS fornece também um mapa de distribuição dos diferentes elementos presentes na amostra. Os mapas são obtidos através de milhares de varrimentos do feixe de eletrões na área limitada pela imagem apresentada. Quando os detetores sinalizam a presença de um determinado elemento, o *software* do equipamento acrescenta um pixel branco na zona correspondente à área delimitada pela imagem. Na Figura 5.10 são apresentados os mapas de distribuição dos três constituintes principais do papel de fotocópia.



**Figura 5.10** Mapa EDS do papel de fotocópia. As imagens foram coloridas artificialmente de modo a facilitar a leitura das mesmas.

Os mapas de distribuição revelam que os elementos carbono e oxigénio são os seus principais constituintes, sendo possível observar a forma das fibras de celulose nos mapas de distribuição destes dois elementos. O elemento cálcio está presente numa proporção considerável em relação ao carbono



e oxigênio, e o seu mapa de distribuição está de acordo com a presença dos aglomerados entre as fibras de celulose.

### 5.2.5. Análise térmica

A análise térmica dos substratos de papel utilizados no desenvolvimento do sensor de papel foi realizada com o intuito de saber se estes materiais sofrem alguma transformação quando submetidos a temperaturas elevadas, visto que o processo de fabrico dos sensores de papel engloba uma fase de aquecimento a uma temperatura de 140 °C. As curvas TG e DSC do papel de fotocópia e do papel Whatman encontram-se na Figura 5.11.

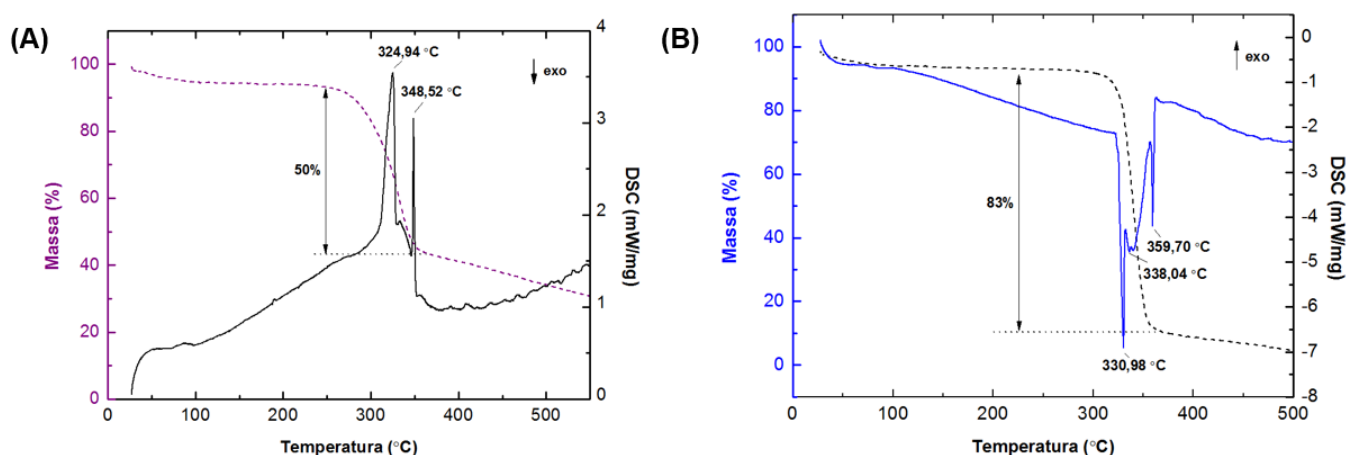


Figura 5.11 Análise térmica dos substratos de papel. (A) Curva TG (a tracejado) e DSC (a cheio) do papel de fotocópia; (B) Curva TG (a tracejado) e DSC (a cheio) do papel Whatman.

Verifica-se que em ambas as amostras ocorre uma primeira perda de massa residual (~2 %) perto dos 100 °C, que corresponde à evaporação da água. A maior perda de massa ocorre entre os 320 e 360 °C que corresponde à degradação da celulose: 50 % no papel de fotocópia, (referente aos picos endotérmicos a 324,94 e 348,52 °C) e 83 % no papel Whatman (referente aos picos endotérmicos a 330,98, 338,04 e 359,70 °C).

As análises de DRX, FTIR e SEM/EDS indicaram a presença de compostos minerais como o carbonato de cálcio no papel de fotocópia e nenhum no papel Whatman. A presença destes compostos pode explicar as diferenças observadas nas curvas de degradação e DSC, uma vez que compostos minerais apresentam temperaturas de degradação mais elevadas do que a celulose.

A análise térmica permite ainda retirar informação acerca da quantidade relativa de celulose e outros constituintes presentes em cada papel analisado. Considerando que a temperatura de degradação da celulose está compreendida no intervalo de caracterização, os resíduos resultantes serão resultado de compostos adicionados às fibras durante a produção de papel. Deste modo, confirmou-se, pela análise das curvas TG, que o papel de fotocópia é o que apresenta maior percentagem de componentes não celulósicos na sua constituição, pois demonstra uma percentagem de massa final de 50 %, por volta dos 350,00 °C e de 30 % aos 500 °C. Do mesmo modo pode concluir-se que o papel Whatman, com massa

final de 13 % apresenta menor percentagem de componentes adicionais na sua constituição, o que está de acordo com os resultados anteriores.

Conclui-se assim que ambos os papéis são termicamente estáveis até aos 320 °C, mostrando assim que não ocorrem transformações nos papéis quando submetidos à temperatura necessária para difusão da cera (140 °C).

### 5.3. Desenvolvimento do sensor de papel

As etapas principais que envolveram o desenvolvimento do sensor de papel descrito neste trabalho foram: (i) formação de barreiras hidrofóbicas no papel para delimitar e isolar zonas de reação; (ii) impregnação das zonas de reação com as WO<sub>3</sub> NPs sintetizadas e (iii) identificação da bactéria eletroquimicamente ativa, *Geobacter sulfurreducens*.

#### 5.3.1. Formação das barreiras hidrofóbicas

O papel Whatman constitui, até à data, o substrato mais utilizado na fabricação de sensores de papel para uso em testes de diagnóstico clínico e/ou testes químicos, em particular na tecnologia *Lab-on-Paper*.<sup>[79]</sup> A definição das barreiras hidrofóbicas, formadas pela difusão da cera por toda a espessura do papel, é necessária para delimitar as zonas hidrofílicas do papel Whatman (ângulo de contacto 12,0 °<sup>[41]</sup>) e, assim criando as zonas de teste/reação, sem que ocorra contaminação entre amostras adjacentes.

No caso do papel de fotocópia, embora este apresente já uma superfície hidrofóbica (Figura 5.12 - A), continua a ser necessária a definição das barreiras hidrofóbicas no papel de forma a ser possível o confinamento de líquidos a uma determinada área. Após a difusão da cera no papel de fotocópia verificou-se um aumento do ângulo de contacto entre o papel de fotocópia com a cera difundida e uma gota de água (Figura 5.12 - B).

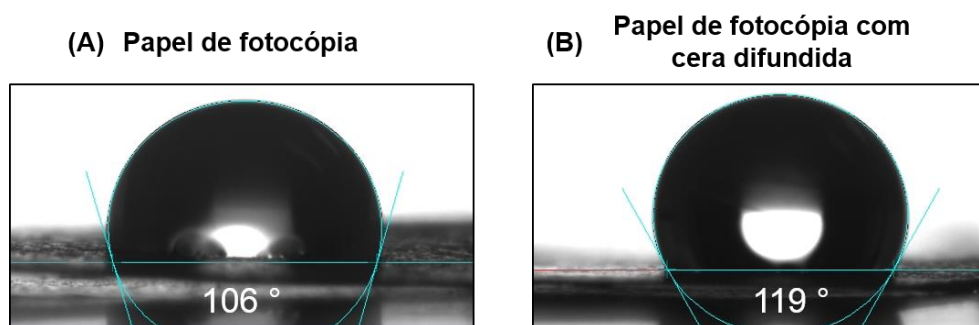


Figura 5.12 Ângulos de contacto formados entre uma gota de água e o papel de fotocópia (A) e o papel de fotocópia com cera difundida (B).

A Figura 5.13 mostra as visões frontal e transversal do que acontece no papel de fotocópia, quando é depositado um certo volume de líquido, antes e depois da difusão da cera. Isto comprova mais uma

vez que embora o papel de fotocópia seja hidrofóbico, sem a definição das barreiras de cera, o confinamento dos líquidos não seria possível.

É importante notar que se verificou que as condições otimizadas na fabricação de sensores com o papel Whatman (temperatura de difusão: 140 °C e tempo de difusão: 2 minutos<sup>[79]</sup>) podem ser usadas para o papel de fotocópia, uma vez que foi possível criar as barreiras hidrofóbicas de cera com sucesso.

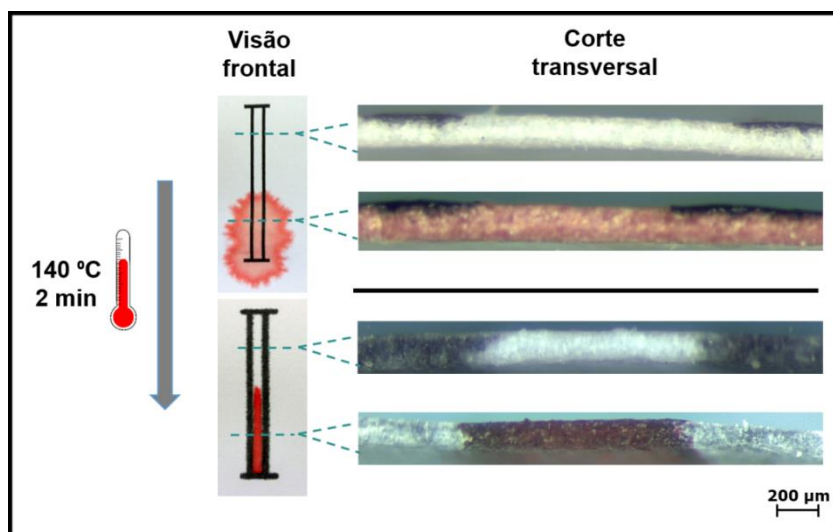


Figura 5.13 Formação das barreiras hidrofóbicas no papel de fotocópia

As diferenças nos ângulos de contacto do papel Whatman e do papel de fotocópia, que se refletem em diferenças nas propriedades superficiais entre ambos os papéis devem-se ao facto de durante o processo de fabrico do papel serem utilizados diferentes aditivos consoante a finalidade do papel. Além disso, na última etapa do processo de fabrico (formação da folha do papel) são ainda efetuados tratamentos superficiais. O conjunto destas ações vai influenciar o ângulo de contacto entre a superfície de cada substrato e a gota de água, influenciado assim a hidrofobicidade do papel.

Mais uma vez, estes resultados corroboram o que foi discutido até agora sobre as diferenças entre estes dois substratos: o papel de fotocópia possui na sua composição aditivos adicionais (especialmente o  $\text{CaCO}_3$ ), enquanto que o papel Whatman é constituído quase unicamente pelas fibras de celulose. Além disso, o facto de a fonte de fibras de celulose destes dois papéis ser diferente também influencia os ângulos de contacto medidos. Na produção do papel de fotocópia é usada a madeira como matéria-prima que, como já foi mencionado, possui na sua composição também hemicelulose e lenhina que são materiais amorfos hidrofóbicos. Embora nenhum destes materiais tenha sido identificada pelas técnicas anteriores no papel de fotocópia, uma vez que estes materiais são separados das fibras de celulose por processos químicos, é possível que existam ainda quantidades residuais destes materiais que embora não identificáveis sejam capazes de influenciar o ângulo de contacto medido.

### 5.3.2. Impregnação dos poços com as WO<sub>3</sub> NPs

Um dos passos mais importantes no processo de fabrico dos sensores de papel produzidos neste trabalho é a impregnação do papel com as WO<sub>3</sub> NPs por um método de *drop casting*, que consiste na deposição no papel de uma gota de solução aquosa de WO<sub>3</sub> NPs e espera até à evaporação do solvente.

De forma a confirmar que as WO<sub>3</sub> NPs ficaram depositadas nos poços do papel foram usadas as técnicas de DRX e FTIR. No entanto, esta análise não foi possível uma vez que os picos característicos tanto do papel de fotocópia como do papel Whatman mascararam os picos característicos das estruturas cristalinas das nanopartículas sintetizadas e depositadas no papel.

Na Figura 5.14 encontram-se as imagens SEM dos dois substratos de papel funcionalizados com as WO<sub>3</sub> NPs de geometria hexagonal (amostra NS3).

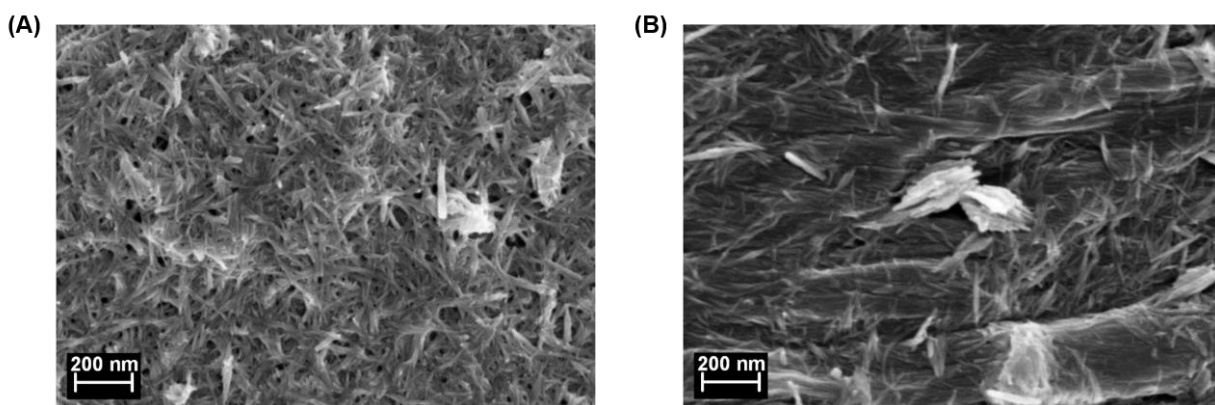


Figura 5.14 Imagens SEM das superfícies dos substratos de papel impregnados com as WO<sub>3</sub> NPs. (A) Papel de fotocópia impregnado com WO<sub>3</sub> NPs; (B) Papel Whatman impregnado com as WO<sub>3</sub> NPs.

Pela comparação das duas imagens é possível observar algumas diferenças, nomeadamente na distribuição mais uniforme das NPs no papel de fotocópia (Figura 5.14 – A) e na adesão mais superficial. Pelo contrário, no papel Whatman (Figura 5.14 – B) verifica-se que a distribuição não é tão uniforme, devido à presença de nano-agregados de WO<sub>3</sub> NPs e que, como este papel é altamente poroso, as NPs tendem a entrar dentro dos poros de papel não formando assim uma camada coesa na superfície de papel, o que é comprovado pelo facto de se conseguir observar as fibras de celulose.

### 5.4. A bactéria *Geobacter sulfurreducens*

Como já foi mencionado anteriormente, a bactéria *G. sulfurreducens* foi usada no decorrer deste trabalho como prova de conceito uma vez que são conhecidas as suas capacidades de transferência eletrónica extracelular. Com o intuito de conhecer a sua morfologia e aparência foi usada a técnica de SEM cuja imagem se encontra na Figura 5.15.



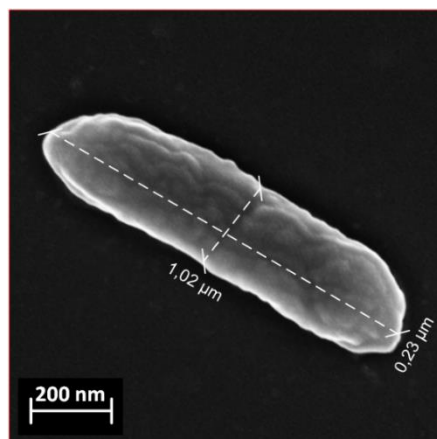


Figura 5.15 Imagem SEM da bactéria *Geobacter sulfurreducens*.

A bactéria apresenta uma forma de bastonete (dimensões de  $1,02 \times 0,23 \mu\text{m}$ ) e uma parede celular rugosa, característico das bactérias Gram-negativas.

Foi também realizada a sua curva de crescimento (Figura 5.16 – A), uma vez que era necessário conhecer o tempo que ela demora a chegar a uma determinada fase do seu crescimento, de modo a que os ensaios colorimétricos realizados fossem reprodutíveis. Além disso, foi também determinado o peso seco em função da absorvância a 600 nm (Figura 5.16 – B) de modo a correlacionar com a concentração da bactéria em peso por volume (g/L.)

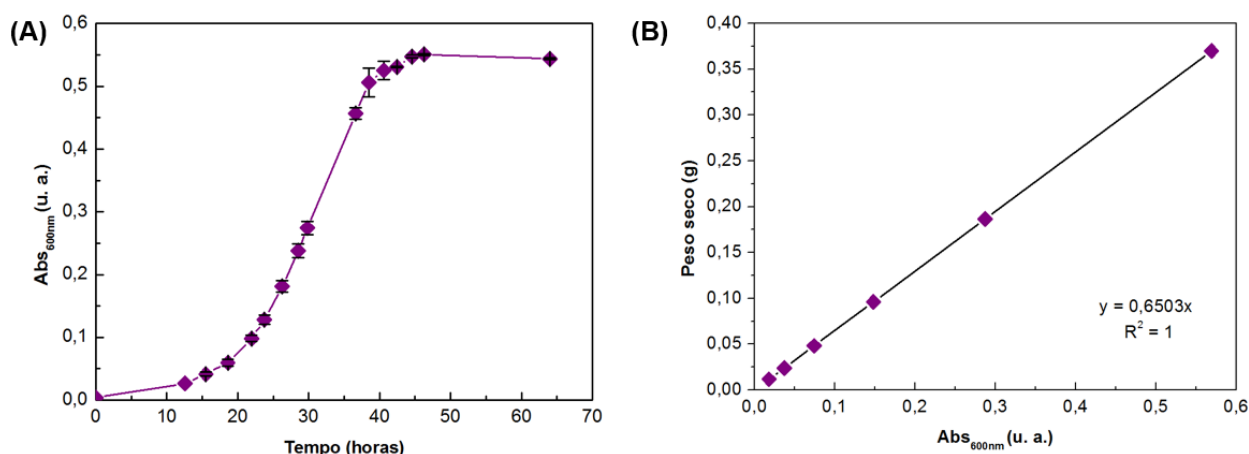


Figura 5.16 (A) Curva de crescimento e (B) Peso seco em função da absorvância a 600 nm da bactéria *G. sulfurreducens*.

Neste trabalho, a detecção colorimétrica da bactéria *G. sulfurreducens* foi realizada em diferentes fases do seu crescimento. Nomeadamente na fase latente ( $\text{Abs}_{600 \text{ nm}} = 0,1$ ) e em três fases distintas da fase exponencial ( $\text{Abs}_{600 \text{ nm}} = 0,2; 0,3; 0,4$  e  $0,5$ ). Não foram realizados ensaios colorimétricos com a bactéria na fase estacionária porque, nesta fase, pode começar já a ocorrer morte celular. As fases de crescimento mencionadas foram correlacionadas com a concentração da bactéria em peso por volume, correspondendo às concentrações de 0,07; 0,13; 0,20; 0,26 e 0,33 g/L, respetivamente.

## 5.5. Ensaios colorimétricos

As amostras de  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas foram utilizadas nos ensaios colorimétricos para avaliar a sua resposta electrocrómica quando em contacto com uma bactéria eletroquimicamente ativa, neste caso, a bactéria *G. sulfurreducens*.

De forma a facilitar a interpretação dos resultados obtidos nos posteriores ensaios colorimétricos, a Tabela 5.5 apresenta a nomenclatura apresentada anteriormente das  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas.

**Tabela 5.5 Nomenclatura das  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas.**

Precursor	ADE	pH	Nomenclatura
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	NaCl	0,0	NC1
		0,4	NC2
		1,8	NC3
	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0,0	NS1
		0,4	NS2
		1,8	NS3
PTA	-	0,0	PT1
		0,4	PT2
		1,8	PT3

Foram realizados ensaios colorimétricos preliminares, em solução, numa microplaca convencional de 96-poços (Figura 5.17). Os resultados obtidos foram registados com o auxílio de uma máquina fotográfica e foram analisados visualmente e com recurso ao *software* de análise de imagem *ImageJ*.

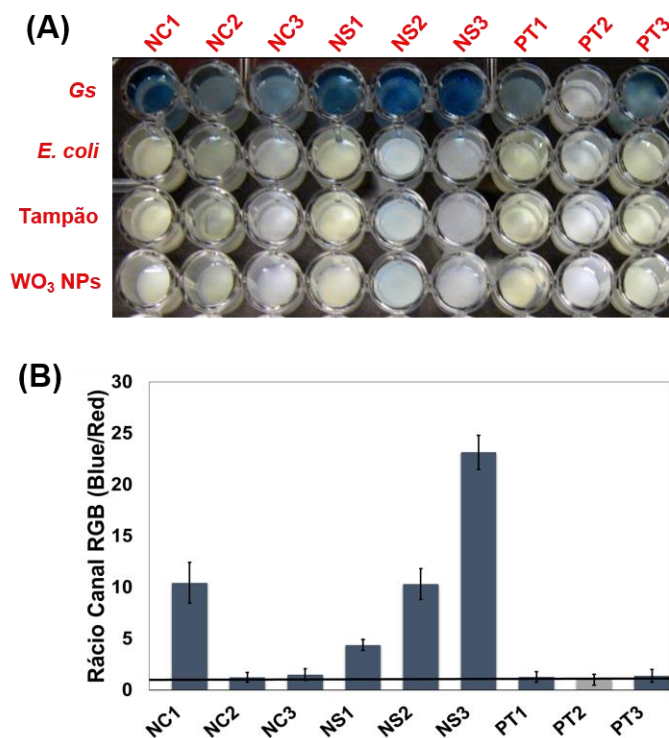


Figura 5.17 Ensaio colorimétrico em solução das WO<sub>3</sub> NPs sintetizadas (5 g/L) com a bactéria *G. sulfurreducens* na fase exponencial-tardia (Abs 600 nm = 0,5, correspondente a 0,33 g/L. Os resultados foram registados após 30 minutos. (A) Fotografia da microplaca de 96-poços com a linha de teste (Gs), os controlos negativos (*E. coli* e tampão) e o branco; (B) Gráfico de barras resultante da análise RGB com o software *ImageJ*.

Foi possível detetar visualmente uma resposta electrocrómica, traduzida pela formação do bronze de tungsténio de cor azul, em todas as amostras, com a exceção da amostra PT2. Sendo que as amostras provenientes do PTA como precursor e as amostras NC2 e NC3 possuem uma resposta electrocrómica muito ténue. A bactéria *E. coli* e o tampão no qual as células de *G. sulfurreducens* foram ressuspensas foram também testados para comprovar que a mudança de cor se deve unicamente à transferência de eletrões da *G. sulfurreducens* para as WO<sub>3</sub> NPs com consequente formação dos bronzes de tungsténio.

O software *ImageJ* foi utilizado na análise RGB (*Red Green Blue*) dos resultados obtidos. Esta análise dá as intensidades relativas de cada canal, que variam entre 0 e 255, sendo todas 0 quando a cor é preta e 255 quando a cor é branca. Uma vez que na análise dos ensaios colorimétricos em questão o importante é avaliar a intensidade da cor azul foi calculado o rácio entre a média aritmética das intensidades do canal *Blue* e do canal *Red* obtidos para cada zona de teste. Os rácios superiores ao *threshold* de 1 são considerados resultados positivos e os rácios inferiores a 1 são considerados resultados negativos.

Na Figura 5.17 – B encontra-se o gráfico de barras resultante da análise RGB da primeira linha do ensaio colorimétrico (com a bactéria *G. sulfurreducens*). Os restantes rácios calculados para os controlos negativos encontram-se em anexo, na secção B.1. Verifica-se mais uma vez que a resposta electrocrómica ocorre em todas as amostras exceto na PT2 e que a amostra com maior rácio é a amostra NS3 que corresponde às WO<sub>3</sub> NPs com estrutura cristalográfica hexagonal. Este resultado corrobora o discutido anteriormente sobre as propriedades electrocrómicas superiores das WO<sub>3</sub> NPs com geometria

hexagonal, uma vez que esta estrutura cristalográfica permite uma melhor intercalação de iões devido aos túneis formados entre os octaedros de  $\text{WO}_6$ . Além disto, a forma de nanofios unidimensional origina uma estrutura com uma elevada área superficial e superior densidade atómica, que pode interagir facilmente com as EAB.

Este método de deteção colorimétrico das EAB em microplacas de 96 poços foi já descrito por Yuan, *et al*<sup>[35]</sup>, para as  $h\text{-WO}_3$  NPs. No entanto, o uso da microplaca como suporte para os ensaios colorimétricos apresenta desvantagens, sendo algumas delas: (i) as microplacas são normalmente feitas de poliestireno ou polipropileno, que são materiais não biodegradáveis, resultando num elevado impacto ambiental; (ii) elevado custo; (iii) dificuldade no registo dos resultados por digitalização ou fotografia e (iv) dificuldade na análise dos resultados devido à presença de reflexos e/ou brilhos. Este trabalho pretende assim solucionar estes problemas através do uso de um material biodegradável, de baixo custo e de fácil de manuseamento, tanto no decorrer do ensaio colorimétrico como nos registos e análise dos resultados – o papel.

Sendo que o objetivo principal deste trabalho consiste no desenvolvimento de um sensor de papel para a deteção de bactérias eletroquimicamente ativas, foram produzidos sensores de papel com os dois substratos caracterizados anteriormente – papel de fotocópia e papel Whatman – que foram impregnados com as nove amostras de  $\text{WO}_3$  NPs sintetizadas pelo método hidrotermal, nos respetivos poços. O primeiro ensaio colorimétrico em papel (Figura 5.18) foi realizado nas mesmas condições que o ensaio em solução (igual concentração de  $\text{WO}_3$  NPs (5 g/L), igual concentração da bactéria *G. sulfurreducens* ( $\text{Abs}_{600\text{ nm}} = 0,5$ , correspondente a 0,33 g/L) e igual diâmetro dos poços ( $d = 7\text{ mm}$ )), com a diferença de que os volumes de solução de  $\text{WO}_3$  NPs e de *G. sulfurreducens*, *E. coli* e tampão foram reduzidos para metade (40  $\mu\text{L}$   $\text{WO}_3$  NPs e 80  $\mu\text{L}$  de Gs, *E. coli* e tampão).

Embora apenas sejam analisados e discutidos os resultados dos ensaios colorimétricos dos sensores de papel fabricados a partir dos dois substratos mencionadas (papel de fotocópia e papel Whatman), foram também testados outros tipos de papel cujos resultados se encontram no Anexo C.

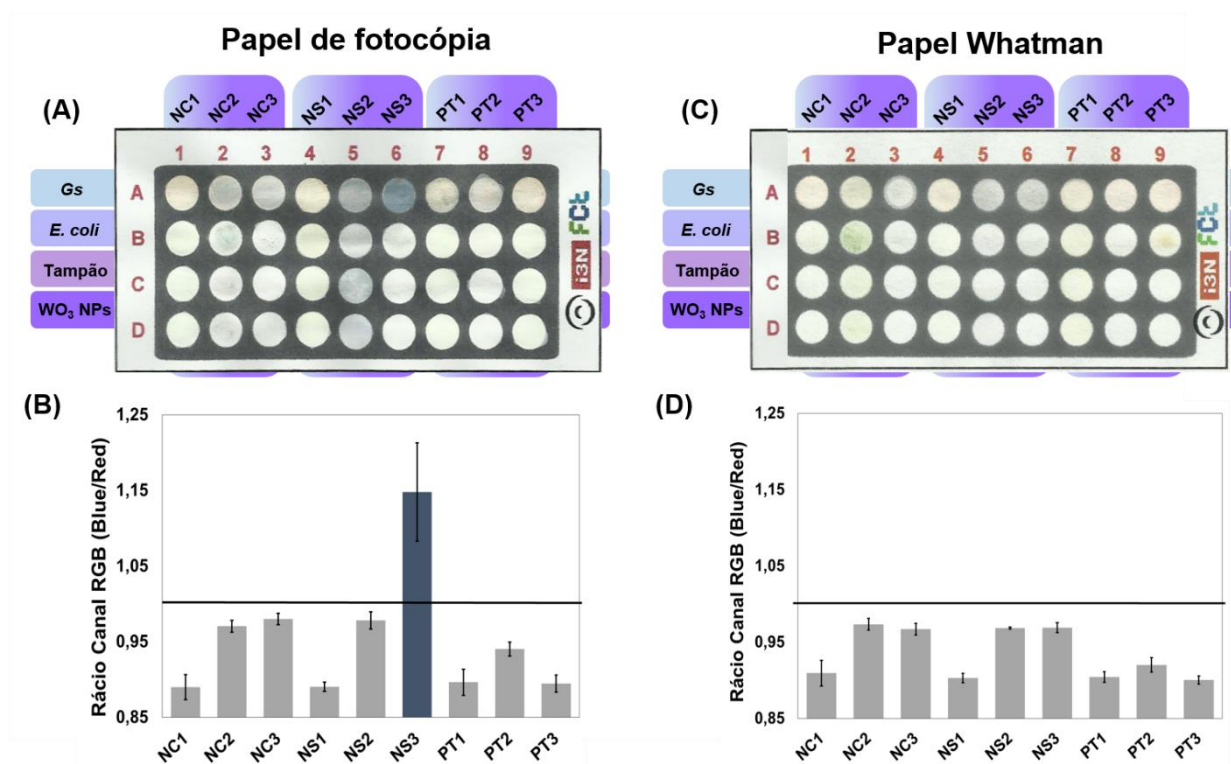


Figura 5.18 Ensaio colorimétrico em papel das WO<sub>3</sub> NPs sintetizadas (5 g/L) com a bactéria *G. sulfurreducens* na fase exponencial-tardia ( $Abs_{600\text{ nm}} = 0,5$ , correspondente a 0,33 g/L). Os resultados foram registados após 4 horas. (A) Fotografia do sensor de papel de fotocópia com a linha de teste (Gs), os controlos negativos (*E. coli* e tampão) e o branco; (B) Gráfico de barras resultante da análise RGB com o software *ImageJ*; (C) Fotografia do sensor de papel Whatman com a linha de teste (Gs), os controlos negativos (*E. coli* e tampão) e o branco; (D) Gráfico de barras resultante da análise RGB com o software *ImageJ*.

Verificou-se, no caso do papel de fotocópia, que a resposta eletrocromática ocorre apenas com as WO<sub>3</sub> NPs com estrutura cristalográfica hexagonal (amostra NS3), com uma razão RGB de  $1,15 \pm 0,07$ , o que está de acordo com o discutido anteriormente. Por outro lado, no caso do papel Whatman não se verificou qualquer resposta electrocromática em nenhuma das amostras de WO<sub>3</sub> NPs. Isto pode ser justificado pelas imagens SEM dos substratos de papel funcionalizados com as WO<sub>3</sub> NPs (Figura 5.14), onde é possível observar que a distribuição das NPs é mais uniforme no papel de fotocópia e que, no papel Whatman que é mais poroso, as NPs entram nos poros do papel não ficando tão disponíveis para interagirem com as EAB. Os rácios RGB calculados para os controlos negativos encontram-se em anexo, na secção B.2.

O facto de no ensaio colorimétrico convencional, em solução, ter ocorrido resposta electrocromática com a maioria das amostras pode ser explicado pela concentração mais elevada das NPs e pela maior facilidade das EAB para interagirem com as NPs em solução, em vez de imobilizadas na superfície de um substrato.

Depois de encontrada a amostra de WO<sub>3</sub> NPs que muda de cor para azul quando em contacto com uma EAB procedeu-se à optimização do método de deteção. Realizou-se assim um ensaio colorimétrico para avaliar a influência da concentração das *h*-WO<sub>3</sub> NPs (amostra NS3) na deteção das EAB.

Na Figura 5.19 é apresentada a fotografia do sensor de papel descrito, assim como a análise RGB dos resultados.

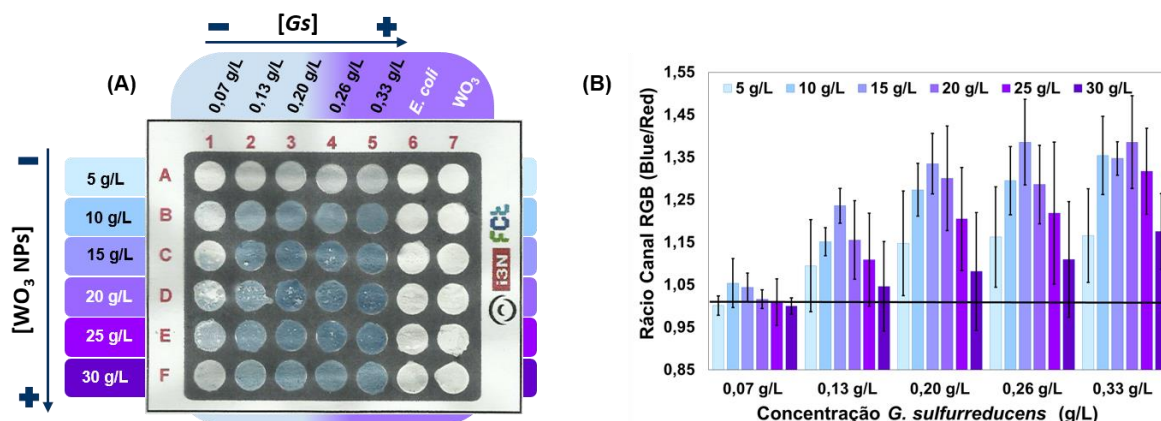
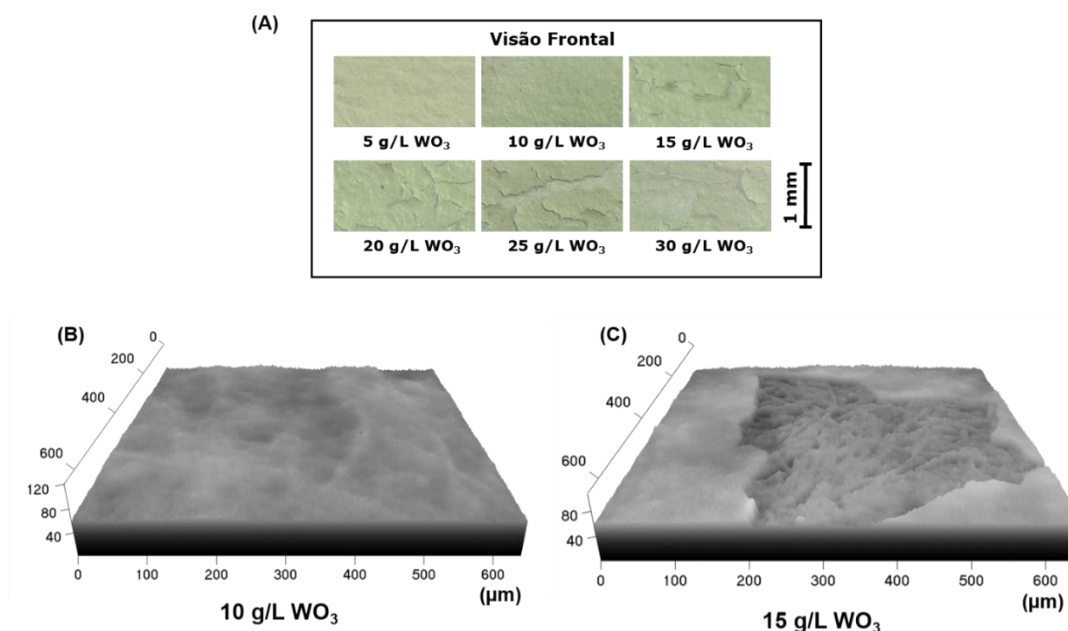


Figura 5.19 Ensaio colorimétrico de otimização no sensor de papel de fotocópia com poços 7,00 x 7,00 mm, com registo de resultados após 4 horas. (A) Fotografia do sensor de papel. Variação da concentração das nanopartículas de  $h\text{-WO}_3$  de 5 a 30 g/L (linhas A - F), variação da concentração de  $G. sulfurreducens$  de 0,07 a 0,33 g/L (linhas 1 – 5), controlo negativo (linha 6) e branco (linha 7); (B) Análise RGB dos resultados obtidos com as várias concentrações de  $h\text{-WO}_3$  NPs e  $G. sulfurreducens$ .

Verifica-se que a deteção da bactéria *G. sulfurreducens* é possível a uma concentração baixa (0,07 g/L, correspondente à fase latente do crescimento:  $\text{Abs}_{600 \text{ nm}} = 0,1$ ), principalmente às concentrações de  $h\text{-WO}_3$  NPs de 10 e 15 g/L, com um rácio RGB de  $1,05 \pm 0,05$  e  $1,04 \pm 0,03$ , respetivamente. Este resultado mostra a sensibilidade do sensor a concentrações baixas de EAB. Os rácios RGB calculados para os controlos negativos encontram-se em anexo, na secção B.3.

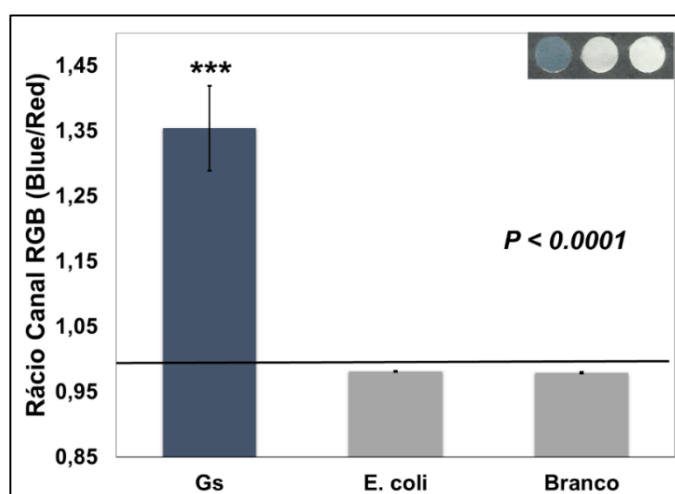
As imagens ampliadas da superfície dos poços impregnados com as  $\text{WO}_3$  NPs foram obtidas (Figura 5.20 – A). Esta análise mostrou que quando a concentração de nanopartículas é superior a 10 g/L, a distribuição da dispersão de  $\text{WO}_3$  NPs no papel não é uniforme o que leva a resultados heterogéneos e, como tal, não reproduzíveis. Na Figura 5.20 – B estão representadas as imagens em relevo da superfície do papel com as NPs à concentração de 10 g/L, que evidencia uma camada uniforme e, à concentração de 15 g/L onde é possível observar a inexistência de NPs em algumas zonas. Por esta razão, definiu-se a concentração de 10 g/L como a condição ótima a ser utilizada na deteção de EAB. Com esta concentração foi possível detetar a bactéria *G. sulfurreducens* desde a fase latente à fase exponencial-tardia (0,33 g/L que corresponde a  $\text{Abs}_{600 \text{ nm}} = 0,5$ ), com rácios RGB de  $1,05 \pm 0,05$  até  $1,35 \pm 0,09$ .



**Figura 5.20** Imagens ampliadas da superfície do papel de fotocópia funcionalizados com as  $\text{WO}_3$  NPs de geometria hexagonal. (A) Imagens da superfície do papel impregnado com as  $\text{WO}_3$  NPs obtidas por Microscopia digital; (B) Imagens da superfície do papel impregnado com 10 g/L e 15 g/L de  $\text{WO}_3$  NPs obtidas por Microscopia confocal.

A Figura 5.21 representa a análise RGB do ensaio colorimétrico nas condições otimizadas: (i) sensor de papel com o substrato papel de fotocópia, (ii)  $\text{WO}_3$  NPs com geometria hexagonal (iii) concentração de NPs de 10 g/L e (iv) *G. sulfurreducens* na fase de crescimento exponencial-tardia.

Uma análise estatística ANOVA com o teste de comparação múltiplo de *Tukey* foi realizada com o software *GraphPad Prism 6*, de forma a validar os resultados obtidos. Esta análise mostrou que a diferença entre o resultado positivo (com a bactéria Gs) e os resultados negativos (bactéria *E. coli* e branco) é estatisticamente significativa, com  $P < 0,0001$  (Anexo D.1). Este resultado prova a especificidade do sensor de papel desenvolvido.



**Figura 5.21** Análise RGB das condições otimizadas para a detecção de EAB, no sensor de papel de fotocópia com dimensões dos poços a mimetizar microplacas de 96 poços.



Embora, não tenham existido resultados positivos nos ensaios colorimétricos realizados com o papel Whatman, foi também realizado o ensaio colorimétrico de otimização para verificar se a resposta eletrocromica ocorreria a concentrações mais elevadas de  $\text{WO}_3$  NPs, o que não se verificou (Figura 5.22).

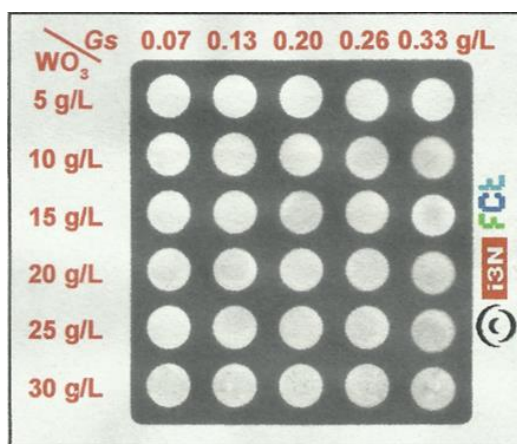


Figura 5.22 Ensaio colorimétrico de otimização no sensor de papel Whatman, com registo de resultados após 4 horas. Variação da concentração das nanopartículas de  $h\text{-WO}_3$  de 5 a 30 g/L (linhas A - F), variação da concentração de *G. sulfurreducens* de 0,07 a 0,33 g/L (linhas 1 – 5), controlo negativo (linha 6) e branco (linha 7).

A observação do desenvolvimento da cor azul ao longo do tempo permitiu concluir que o tempo de resposta do sensor de papel otimizado (Figura 5.20) é limitado pelo tempo que as gotas de amostra ( $V = 50 \mu\text{L}$ ) demoram a secar (aproximadamente 4 horas). De forma a verificar se era possível diminuir este tempo de resposta foram feitos ensaios colorimétricos adicionais com poços de dimensões mais pequenas. Este sensor de papel foi projetado de forma a mimetizar os poços das microplacas de 384 poços ( $3,84 \times 3,84 \text{ mm}$ ), com uma diminuição na área do poço de 2,5 x, em relação aos sensores de papel a mimetizar as microplacas de 96 poços ( $7 \times 7 \text{ mm}$ ). Os poços foram impregnados com uma quantidade 4 x menor de solução de  $h\text{-WO}_3$  NPs e a diminuição no volume de amostra utilizado foi proporcional à diminuição da dimensão do poço (2,5 x, o que corresponde a  $V = 20 \mu\text{L}$ ).

As fotografias dos resultados obtidos assim como a análise RGB dos mesmos está apresentada na Figura 5.23.

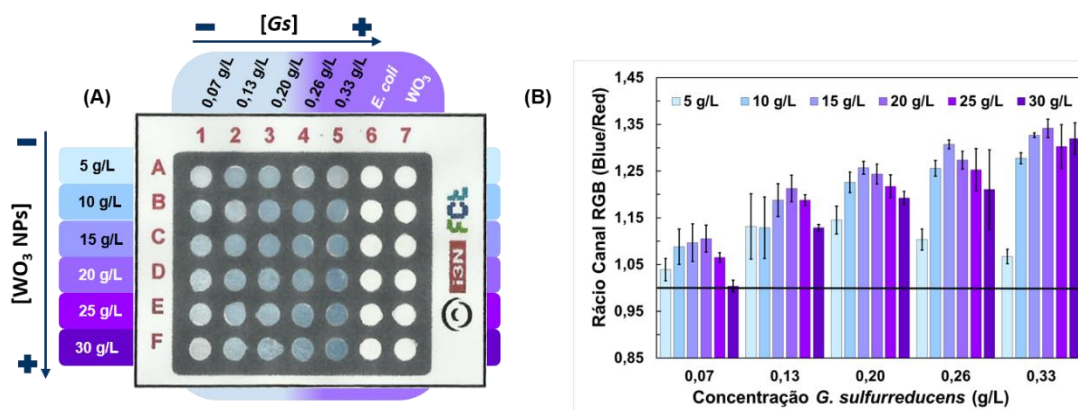


Figura 5.23 Ensaio colorimétrico de otimização no sensor de papel de fotocópia com poços  $3,84 \times 3,84 \text{ mm}$ , com registo de resultados após 2 horas. (A) Fotografia do sensor de papel. Variação da concentração das nanopartículas de  $h\text{-WO}_3$  de 5 a 30 g/L (linhas A – F), variação da concentração de *G. sulfurreducens* de 0,07 a 0,33 g/L (linhas 1 – 5), controlo negativo (linha 6) e branco (linha 7); (B) Análise RGB dos resultados obtidos com as várias concentrações de  $h\text{-WO}_3$  NPs e *G. sulfurreducens*.



A partir deste ensaio colorimétrico conclui-se que a detecção da EAB *G. sulfurreducens* é possível com um sensor de papel com poços de dimensões mais reduzidos e, consequentemente menor volume de amostra. Isto resultou num tempo de resposta mais rápido em relação ao sensor anterior (2 horas em vez de 4 horas). A Figura 5.23 – B mostra a análise RGB da cor resultante do contacto entre as células de *G. sulfurreducens* com as *h*-WO<sub>3</sub> NPs nas diferentes concentrações. Os restantes rácios RGB calculados para os controlos negativos encontram-se em anexo, na secção B.4. A partir desta análise é possível concluir que as dispersões de *h*-WO<sub>3</sub> NPs a 15 e 20 g/L originam os maiores rácios RGB quando comparados com as outras concentrações estudadas. Além disso, a concentração de 15 g/L apresenta uma resposta mais linear com a variação de concentração da bactéria (Figura 5.24).

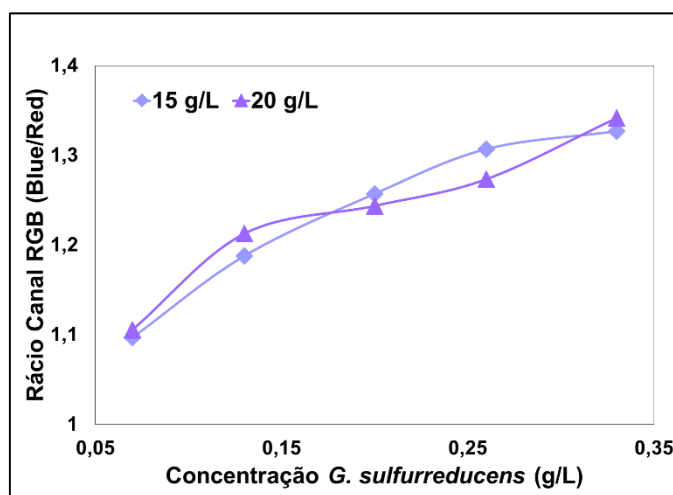


Figura 5.24 Representação gráfica da variação do rácio RGB com a concentração de bactéria no sensor de papel com dispersão de *h*-WO<sub>3</sub> NPs a 15 g/L (losangos) e a 20 g/L (triângulos).

Por esta razão, o sensor final (Figura 5.26) foi impregnado com uma dispersão de *h*-WO<sub>3</sub> NPs com concentração de 15 g/L. Embora esta concentração seja superior à utilizada no sensor anterior (10 g/L) o rácio de nanopartículas por área manteve-se (0,014 g/mm<sup>2</sup>).

A Figura 5.25 mostra a análise RGB mais detalhada (com o controlo negativo (*E. coli*) e o branco) do ensaio colorimétrico com as NPs a 15 g/L e a bactéria com a maior concentração (0,33 g/L).

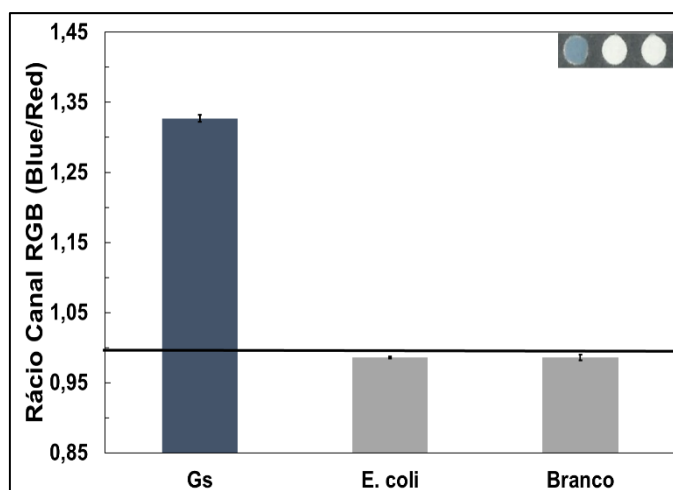


Figura 5.25 Análise RGB das condições otimizadas para a detecção de EAB, no sensor de papel de fotocópia com dimensões dos poços a mimetizar microplacas de 96 poços.

A cor resultante apresenta um rácio RGB de  $1,33 \pm 0,005$ , enquanto que o controlo negativo e o branco apresenta rácios equivalentes de  $0,98 \pm 0,001/0,004$ , respetivamente. Este resultado revela também uma diferença estatística significativa, entre o resultado positivo e negativo, com  $P < 0,0001$  (Anexo D.2), provando mais uma vez a especificidade do sensor colorimétrico desenvolvido para a detecção de bactérias eletroquimicamente ativas. Adicionalmente, verifica-se também que a detecção da bactéria *G. sulfurreducens* na fase latente é possível com um rácio RGB de  $1,10 \pm 0,04$ , mostrando que a diminuição dos poços/volume de amostra aumenta a sensibilidade do sensor.

A Figura 5.26 mostra o sensor colorimétrico de papel otimizado, com as imagens ampliadas representativas do que acontece no caso de um ensaio com uma resposta positiva. O protótipo do sensor encontra-se em anexo (Anexo E).

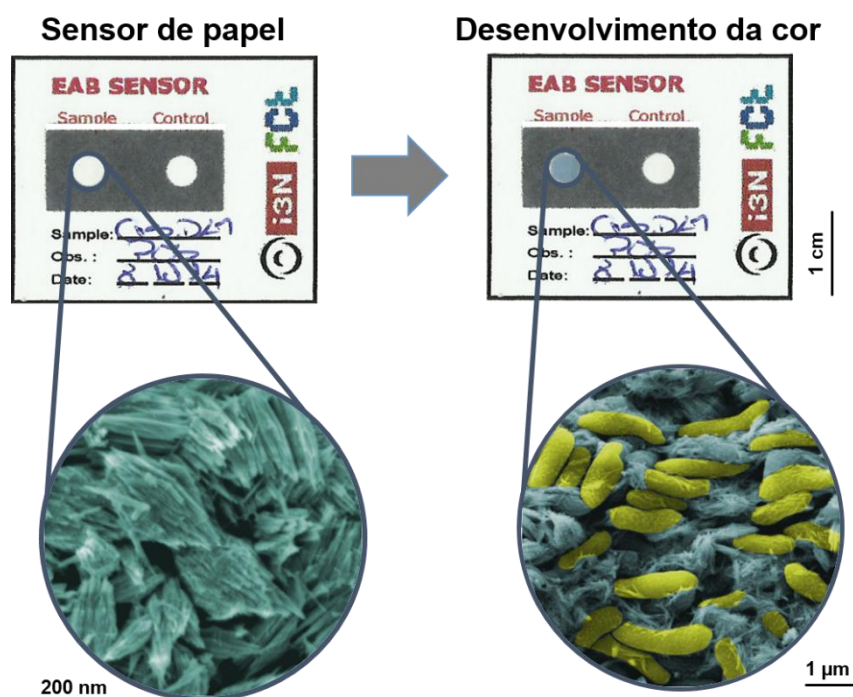


Figura 5.26 Sensor colorimétrico final otimizado para a detecção de bactérias eletroquimicamente ativas. As imagens SEM representam os resultados obtidos antes e depois do ensaio colorimétrico ( $\text{WO}_3$  NPs a azul e bactéria *G. sulfurreducens* a amarelo).

Por último, foi realizado a análise de custos do sensor de papel desenvolvido, apresentando um custo de aproximadamente 0,4 cêntimos por unidade. Nesta análise não foram tidos em conta os gastos de eletricidade dos aparelhos utilizados (micro-ondas, forno, impressora de cera e placa térmica).

Tabela 5.6 Análise de custos do sensor de papel desenvolvido.

Material	Quantidade	Custo	Custo/sensor
Papel 300 % Portucel	35 x 30 mm	$1,9 \times 10^{-3} \text{ €/m}^2$	$1,9 \times 10^{-4} \text{ €}$
Cera	3 x 35 x 30 mm	$0,28 \text{ €/m}^2$	$8,2 \times 10^{-4} \text{ €}$
$h\text{-WO}_3$ NPs	0,3 mg	$9,1 \times 10^{-3} \text{ €/mg}$	$2,7 \times 10^{-3} \text{ €}$
<b>Total</b>			<b><math>3,7 \times 10^{-3} \text{ €}</math></b>



## 6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

No âmbito deste trabalho utilizou-se papel como suporte no desenvolvimento de um sensor para a deteção colorimétrica de bactérias eletroquimicamente ativas.

A presença ou ausência de uma EAB (*Geobacter sulfurreducens*) numa cultura celular foi testada através do uso de um material electrocrómico,  $\text{WO}_3$ , que muda a sua cor de branco para azul quando em contacto com estas bactérias, devido à reação de redução.

O uso do papel como suporte neste tipo de métodos de deteção apresenta vantagens como o baixo custo, abundância, disponibilidade e biodegradabilidade. Além disso, devido à cor branca da sua superfície proporciona um elevado contraste facilitando os métodos de análise da imagem e, em particular, a utilização de sensores colorimétricos. Neste trabalho foram caracterizados e testados dois tipos de papel: papel de fotocópia e papel Whatman. O papel de fotocópia revelou ter uma superfície mais lisa, uniforme e com menor porosidade do que o papel Whatman o que facilitou a distribuição uniforme das  $\text{WO}_3$  NPs, resultando na identificação com sucesso da bactéria *Geobacter sulfurreducens*.

O uso de um método hidrotermal com radiação de micro-ondas na síntese das  $\text{WO}_3$  NPs trouxe diversas vantagens em relação aos métodos convencionais: (i) tempos de reação rápidos (1 hora em vez de 8 horas); (ii) controlo da estrutura e morfologia das nanopartículas e (iii) baixo custo energético. O estudo sobre a influência de vários fatores na síntese das  $\text{WO}_3$  NPs, nomeadamente, os precursores, os agentes direcionais de estrutura e o pH de síntese foi realizado e permitiu a obtenção de três estruturas cristalográficas distintas: monoclinica, ortorrômbica hidratada e hexagonal. Este estudo mostrou que quando a síntese é realizada a pH 0,0 a estrutura cristalográfica resultante é sempre monoclinica independentemente do precursor e/ou ADE utilizado. No caso da síntese a pH 0,4 a estrutura predominante é a ortorrômbica e a pH 1,8 são obtidas as três estruturas cristalográficas. Além disso, permitiu também concluir que a estrutura cristalográfica hexagonal com morfologia de nanofios só é obtida quando o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  é utilizado como ADE.

As amostras de  $\text{WO}_3$  NPs obtidas foram utilizadas nos ensaios colorimétricos, em solução e em papel, para testar a presença da bactéria *G. sulfurreducens*. A identificação positiva desta bactéria no sensor de papel foi conseguida com a amostra de nanofios de  $\text{WO}_3$  de estrutura cristalográfica hexagonal, devido aos benefícios da sua geometria (túneis hexagonais e cavidades trigonais) e da sua morfologia (estrutura unidimensional com elevada área superficial e densidade superficial atómica). Esta amostra foi então utilizada na otimização do método de deteção colorimétrico e respetivo desenvolvimento do sensor de papel final. A avaliação da cor resultante dos ensaios colorimétricos foi realizada com recurso a um *software* de edição de imagem, *ImageJ*, que calcula as intensidades RGB de uma zona selecionada. O rácio entre as intensidades RGB dos canais *Blue* e *Red* permitiu a distinção entre resultados positivos (rácio maior que 1) e negativos (rácio menor que 1).

Verificou-se que a utilização de uma dispersão de *h-WO*<sub>3</sub> NPs com concentração de 15 g/L para impregnar a zona de reação no sensor de papel permite a identificação positiva da bactéria *Geobacter sulfurreducens* numa fase inicial de crescimento (fase latente, correspondente 0,07 g/L) com um rácio RGB de  $1,10 \pm 0,040$ . A deteção da bactéria na sua fase de maior crescimento apresentou um rácio RGB de  $1,33 \pm 0,005$ , com um  $P < 0,0001$  em relação ao controlo negativo.

Estes resultados demonstram que o sensor de papel desenvolvido para a detecção de bactérias eletroquimicamente ativas é sensível e específico. Além disso, representa uma alternativa mais simples, rápida e de menor custo aos métodos existentes atualmente para detetar a presença destas bactérias.

A aplicação da tecnologia desenvolvida no decorrer desta dissertação pode ser feita nos laboratórios de investigação da área, facilitando assim a detecção destas bactérias. Além da detecção pode também ser usado em diversos estudos que clarificam, por exemplo, os mecanismos de transferência eletrónica destas bactérias. Adicionalmente, o estudo efetuado sobre a síntese das WO<sub>3</sub> NPs por um método hidrotermal pode também dar um importante contributo na área dos materiais electrocrómicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Regan, B. Logan, *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 1, 5172.
- [2] J. Babauta, R. Renslow, Z. Lewandowski, H. Beyenal, *Biofouling* **2012**, 28, 789.
- [3] G. Reguera, K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, D. R. Lovley, *Nature* **2005**, 435, 1098.
- [4] C. M. Fennessey, A Novel Mode of Bacterial Respiration: Iron Solubilization Prior to Electron Transfer, Georgia Institute of Technology, **2010**.
- [5] O. Bretschger, A. Obraztsova, C. Sturm, I. S. Chang, Y. Gorby, S. B. Reed, D. E. Culley, C. L. Reardon, S. Barua, M. F. Romine, J. Zhou, A. S. Beliaev, R. Bouhenni, D. Saffarini, F. Mansfeld, B.-H. Kim, J. K. Fredrickson, K. H. Nealson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 7003.
- [6] D. R. Lovley, *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, 1, 35.
- [7] B. R. Ringeisen, S. E. Lizewski, L. Fitzgerald, J. C. Biffinger, C. L. Knight, W. J. Crookes-Goodson, P. K. Wu, *Electroanalysis* **2010**, 22, 875.
- [8] C. N. Mulligan, R. Galvez-Cloutier, *Environ. Monit. Assess.* **2003**, 84, 45.
- [9] S. M. Strycharz-Glaven, R. M. Snider, A. Guiseppi-Elie, L. M. Tender, *Energy Environ. Sci.* **2011**, 4, 4366.
- [10] G. Reguera, K. P. Nevin, J. S. Nicoll, S. F. Covalla, T. L. Woodard, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 7345.
- [11] H. Richter, M. Lanthier, K. P. Nevin, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 5347.
- [12] B. Erable, N. Duțeanu, M. Ghangrekar, *Biofouling* **2010**, 26, 57.
- [13] M. C. Potter, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **1911**, 84, 260.
- [14] L. Peixoto, G. Martins, D. Amorim, P. Parpot, R. Nogueira, D. Brito, em *11º Simpósio Hidráulica E Recur. Hídricos Dos Países Expressão Port.*, **2013**, pág. 1–11.
- [15] G. T. Kim, G. Webster, J. W. T. Wimpenny, B. H. Kim, H. J. Kim, A. J. Weightman, *J. Appl. Microbiol.* **2006**, 101, 698.
- [16] B. E. Logan, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 375.
- [17] H. Hou, L. Li, Y. Cho, P. Figueiredo, A. Han, *PLoS One* **2009**, 4, 6570.
- [18] A. Elmekawy, H. M. Hegab, X. Dominguez-Benetton, D. Pant, *Bioresour. Technol.* **2013**, 142, 672.
- [19] V. Fedorovich, M. C. Knighton, E. Pagaling, F. B. Ward, A. Free, I. Goryanin, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75, 7326.
- [20] R. Anderson, H. Vrionis, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 5884.
- [21] M. Barlett, K. Zhuang, R. Mahadevan, D. R. Lovley, *Biogeosciences* **2012**, 9, 1033.
- [22] D. L. Cologgi, S. Lampa-Pastirk, A. M. Speers, S. D. Kelly, G. Reguera, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 15248.
- [23] A. P. Borole, G. Reguera, B. Ringeisen, Z.-W. Wang, Y. Feng, B. H. Kim, *Energy Environ. Sci.* **2011**, 4, 4813.
- [24] W. Verstraete, K. Rabaey, *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 5181.
- [25] D. R. Lovley, T. Ueki, T. Zhang, N. S. Malvankar, P. M. Shrestha, K. Flanagan, M. Aklujkar, J. E. Butler, L. Giloteaux, A.-E. Rotaru, D. E. Holmes, A. E. Franks, R. Orellana, C. Risso, K. P. Nevin, *Geobacter: The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications*, **2011**.
- [26] D. R. Bond, D. E. Holmes, L. M. Tender, D. R. Lovley, *Science* **2002**, 295, 483.
- [27] J. D. Coates, E. J. Phillips, D. J. Lonergan, H. Jenter, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 1531.
- [28] R. G. Arnold, T. J. DiChristina, M. R. Hoffmann, *Biotechnol. Bioeng.* **1988**, 32, 1081.
- [29] H. S. Park, B. H. Kim, H. S. Kim, H. J. Kim, G. T. Kim, M. Kim, I. S. Chang, Y. K. Park, H. I. Chang, *Anaerobe* **2001**, 7, 297.
- [30] Y. Zuo, D. Xing, J. M. Regan, B. E. Logan, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74, 3130.
- [31] D. R. Lovley, S. J. Giovannoni, *Arch. Microbiol.* **1993**, 159, 336.
- [32] C. A. Pham, S. J. Jung, N. T. Phung, J. Lee, I. S. Chang, B. H. Kim, H. Yi, J. Chun, *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, 223, 129.
- [33] Y. Wu, K. Guan, Z. Wang, B. Xu, F. Zhao, *PLoS One* **2013**, 8, 73442.
- [34] Q. Ye, Y. Roh, S. L. Carroll, B. Blair, J. Zhou, C. L. Zhang, M. W. Fields, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 5595.
- [35] S.-J. Yuan, H. He, G.-P. Sheng, J.-J. Chen, Z.-H. Tong, Y.-Y. Cheng, W.-W. Li, Z.-Q. Lin, F. Zhang, H.-Q. Yu, *Sci. Rep.* **2013**, 3, 1315.

- [36] J. Biffinger, M. Ribbens, B. Ringeisen, J. Pietron, S. Finkel, K. Nealson, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 436.
- [37] M. Zhou, M. Yang, F. Zhou, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *55*, 39.
- [38] N. Correia, Produção E Caracterização de Dispositivos Electrocrómicos Em Substratos À Base de Celulose, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, **2008**.
- [39] G. Smook, *Handbook for Pulp & Paper Technologists*, **1992**.
- [40] J. C. Roberts, *The Chemistry of Paper*, **1996**.
- [41] M. Costa, Desenvolvimento de Microfluídica Em Papel Para Utilização Em Biossensores, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, **2012**.
- [42] W. Kenealy, T. Jeffries, em *ACS Symp. Ser.*, **2003**, pág. 210–239.
- [43] J. L. Velho, *Mineral Fillers for Paper Why, What, How*, TECNICELPA - Portuguese Association Of The Pulp And Paper Technicians, Tomar, **2003**.
- [44] B. Veigas, J. M. Jacob, M. N. Costa, D. S. Santos, M. Viveiros, J. Inácio, R. Martins, P. Barquinha, E. Fortunato, P. V. Baptista, *Lab Chip* **2012**, *12*, 4802.
- [45] H. Li, L. Rothberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 14036.
- [46] R. A. Reynolds, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3795.
- [47] F. Xia, X. Zuo, R. Yang, Y. Xiao, D. Kang, A. Vallée-Bélisle, X. Gong, J. D. Yuen, B. B. Y. Hsu, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 10837.
- [48] W. L. Daniel, M. S. Han, J.-S. Lee, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6362.
- [49] X. Xue, F. Wang, X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3244.
- [50] D. C. Hone, A. H. Haines, D. A. Russell, *Langmuir* **2003**, *19*, 7141.
- [51] S. C. Oliveira, R. M. Torresi, *Quim. Nova* **2000**, *23*, 79.
- [52] S.-H. Lee, R. Deshpande, P. A. Parilla, K. M. Jones, B. To, A. H. Mahan, A. C. Dillon, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 763.
- [53] R. J. Mortimer, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2011**, *41*, 241.
- [54] A. K. Singh, E. Sairam, M. Singh, N. Aggarwal, V. Singhal, *Materials for Electrochromic Devices*, **2013**.
- [55] P. J. Wojcik, Printable Organic and Inorganic Materials for Flexible Electrochemical Devices, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, **2013**.
- [56] K. Bange, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **1999**, *58*, 1.
- [57] R. R. Kharade, K. R. Patil, P. S. Patil, P. N. Bhosale, *Mater. Res. Bull.* **2012**, *47*, 1787.
- [58] J.-H. Ha, P. Muralidharan, D. K. Kim, *J. Alloys Compd.* **2009**, *475*, 446.
- [59] S. Rajagopal, D. Nataraj, D. Mangalaraj, Y. Djaoued, J. Robichaud, O. Y. Khyzhun, *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 1335.
- [60] W. Li, *Mater. Lett.* **2008**, *62*, 4149.
- [61] Z. Gu, H. Li, T. Zhai, W. Yang, Y. Xia, Y. Ma, J. Yao, *J. Solid State Chem.* **2007**, *180*, 98.
- [62] S. S. Kalanur, Y. J. Hwang, S. Y. Chae, O. S. Joo, *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1*, 3479.
- [63] S. Komarneni, R. K. Rajha, H. Katsuki, *Mater. Chem. Phys.* **1999**, *61*, 50.
- [64] H. Hayashi, Y. Hakuta, *Materials (Basel)*. **2010**, *3*, 3794.
- [65] S. Komarneni, H. Katsuki, *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 1537.
- [66] A. Phuruangrat, D. J. Ham, S. J. Hong, S. Thongtem, J. S. Lee, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 1683.
- [67] P. J. Wojcik, A. S. Cruz, L. Santos, L. Pereira, R. Martins, E. Fortunato, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 13268.
- [68] J. Jacob, Desenvolvimento de Placas de Microtitulação Em Papel, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, **2013**.
- [69] L. Santos, J. P. Neto, A. Crespo, D. Nunes, N. Costa, I. M. Fonseca, P. Barquinha, L. Pereira, J. Silva, R. Martins, E. Fortunato, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *13*, 12226.
- [70] J. Wang, P. S. Lee, J. Ma, *J. Cryst. Growth* **2009**, *311*, 316.
- [71] Z. Gu, Y. Ma, W. Yang, G. Zhang, J. Yao, *Chem. Commun.* **2005**, 3597.
- [72] K. Huang, Q. Pan, F. Yang, S. Ni, X. Wei, D. He, *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2008**, *41*, 155417.
- [73] Whatman Catalog, *Filter Papers and Membranes: Take a Whatman Filter Paper, Run a Water Sample through It and Test for Suspended Solids. A Simple but Essential Test Undertaken throughout the World*, **2014**.
- [74] A. Mendes, J. M. Ataíde, P. Ferreira, *Determinação Do Índice de Mão : Das Limitações À Comparação Dos Métodos Disponíveis*, **2012**.
- [75] M. Cocca, L. D'Arienzo, L. D'Orazio, *ISRN Mater. Sci.* **2011**, *2011*, 1.
- [76] S. Manente, A. Micheluz, R. Ganzerla, G. Ravagnan, A. Gambaro, *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2012**, *74*, 99.
- [77] K. Ghule, A. V. Ghule, B.-J. Chen, Y.-C. Ling, *Green Chem.* **2006**, *8*, 1034.



- [78] S. Lorusso, *Ancient and Modern Paper Characterization by FTIR and Micro-Raman Spectroscopy*, **2010**.
- [79] M. N. Costa, B. Veigas, J. M. Jacob, D. S. Santos, J. Gomes, P. V Baptista, R. Martins, J. Inácio, E. Fortunato, *Nanotechnology* **2014**, 25, 094006.



## ANEXOS

### A – Fichas cristalográficas das estruturas cristalográficas monoclinica, ortorrômbica hidratada e hexagonal

#### A.1 – Ficha cristalográfica: Monoclínica (*m*-WO<sub>3</sub>)

##### Name and formula

Reference code:	00-043-1035
PDF index name:	Tungsten Oxide
Empirical formula:	O <sub>3</sub> W
Chemical formula:	WO <sub>3</sub>

##### Crystallographic parameters

Crystal system:	Monoclinic
Space group:	P21/n
Space group number:	14
a (Å):	7.2970
b (Å):	7.5390
c (Å):	7.6880
Alpha (°):	90.0000
Beta (°):	90.9100
Gamma (°):	90.0000
Calculated density (g/cm <sup>3</sup> ):	7.28
Volume of cell (10 <sup>6</sup> pm <sup>3</sup> ):	422.88
Z:	8.00
RIR:	5.04

##### Subfiles and Quality

Subfiles:	Inorganic Alloy, metal or intermetallic Corrosion Forensic
Quality:	Calculated (C)

##### Comments

General comments:	Calculation of diffractometer peak intensities done with MICRO-POWD v. 2.2 (D. Smith and K. Smith) using default instrument broadening function (NBS Table), diffracted beam monochromator polarization correction, and atomic scattering factors corrected for anomalous dispersion. Cell parameters from Loopstra, B., <i>Acta Crystallogr.</i> , <b>21</b> 158 (1966). Atomic positions from same source: W(1) in 4e with x=0.254, y=0.037, z=0.282; W(2) in 4e with x=0.250, y=0.023, z=0.784; O(1) in 4e with x=0.005, y=0.042, z=0.211; O(2) in 4e with x=0.993, y=0.474, z=0.218; O(3) in 4e with x=0.288, y=0.262, z=0.286; O(4) in 4e with x=0.211, y=0.259, z=0.730; O(5) in 4e with x=0.292, y=0.043, z=0.008; O(6) in 4e with x=0.279,
-------------------	--

y=0.487, z=0.993. Isotropic thermal parameters estimated as B=1.0 for each atom. Intensity threshold for  $<I=0.1\%$ .  
To replace 24-747.

Additional pattern:

## References

Primary reference: Grier, D., McCarthy, G., North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA., *ICDD Grant-in-Aid*, (1991)

## Peak list

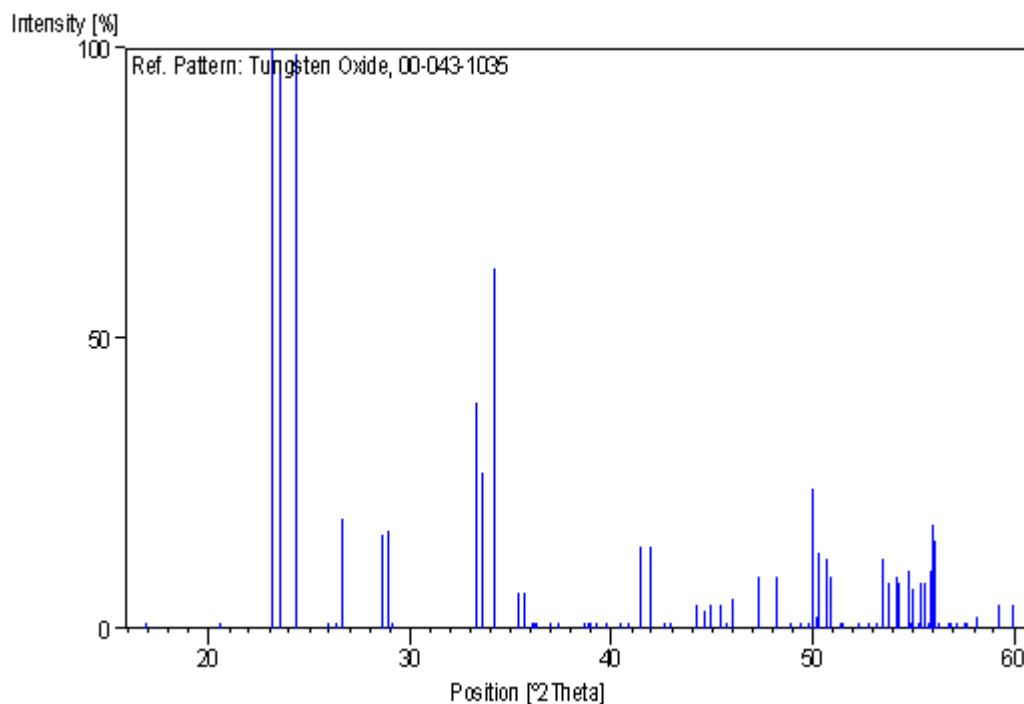
No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	1	1	0	5.24300	16.897	1.0
2	1	1	1	4.30900	20.596	1.0
3	0	0	2	3.84400	23.120	100.0
4	0	2	0	3.76900	23.586	97.0
5	2	0	0	3.64800	24.380	99.0
6	0	1	2	3.42400	26.002	1.0
7	0	2	1	3.38400	26.315	1.0
8	1	2	0	3.34900	26.595	19.0
9	-1	1	2	3.11700	28.615	16.0
10	1	1	2	3.08300	28.938	17.0
11	1	2	1	3.06200	29.141	1.0
12	0	2	2	2.69100	33.267	39.0
13	-2	0	2	2.66700	33.575	27.0
14	2	0	2	2.62300	34.156	62.0
15	-1	2	2	2.53400	35.394	6.0
16	1	2	2	2.51500	35.671	6.0
17	-2	2	1	2.49000	36.041	1.0
18	2	1	2	2.47900	36.206	1.0
19	2	2	1	2.47300	36.297	1.0
20	-1	0	3	2.43000	36.963	1.0
21	1	0	3	2.40600	37.345	1.0
22	-3	0	1	2.32900	38.628	1.0
23	3	1	0	2.31400	38.888	1.0
24	3	0	1	2.30800	38.993	1.0
25	1	1	3	2.29200	39.277	1.0
26	1	3	1	2.26700	39.728	1.0
27	-3	1	1	2.22600	40.491	1.0
28	3	1	1	2.20700	40.855	1.0
29	-2	2	2	2.17700	41.444	14.0
30	2	2	2	2.15400	41.907	14.0
31	0	2	3	2.11900	42.633	1.0
32	0	3	2	2.10300	42.974	1.0
33	3	2	0	2.04400	44.279	4.0
34	1	2	3	2.02700	44.670	3.0
35	1	3	2	2.01600	44.927	4.0
36	-3	1	2	1.99620	45.397	4.0
37	-3	2	1	1.98160	45.751	1.0
38	3	1	2	1.96970	46.043	5.0
39	0	0	4	1.92180	47.259	9.0
40	0	4	0	1.88470	48.248	9.0
41	0	1	4	1.86220	48.869	1.0
42	-2	2	3	1.84290	49.415	1.0
43	0	4	1	1.83050	49.772	1.0
44	-2	3	2	1.82900	49.816	1.0
45	1	4	0	1.82440	49.950	24.0
46	2	3	2	1.81530	50.217	1.0
47	-3	2	2	1.81450	50.241	2.0
48	-1	1	4	1.81110	50.342	13.0

49	1	1	4	1.79770	50.744	12.0
50	3	2	2	1.79450	50.841	9.0
51	-1	4	1	1.77710	51.375	1.0
52	1	4	1	1.77390	51.474	1.0
53	-1	3	3	1.74680	52.333	1.0
54	-4	1	1	1.73340	52.768	1.0
55	4	1	1	1.72170	53.155	1.0
56	0	2	4	1.71180	53.487	12.0
57	3	1	3	1.70480	53.724	8.0
58	0	4	2	1.69220	54.156	9.0
59	2	0	4	1.68920	54.260	8.0
60	2	4	0	1.67450	54.777	10.0
61	-1	2	4	1.67210	54.862	1.0
62	-2	1	4	1.66900	54.972	7.0
63	1	2	4	1.66160	55.238	1.0
64	-4	0	2	1.65810	55.365	8.0
65	-1	4	2	1.65100	55.623	8.0
66	2	1	4	1.64840	55.719	1.0
67	1	4	2	1.64590	55.811	10.0
68	4	2	0	1.64190	55.958	18.0
69	4	0	2	1.63780	56.111	15.0
70	2	4	1	1.63360	56.268	1.0
71	-4	1	2	1.61940	56.806	1.0
72	-2	3	3	1.61710	56.894	1.0
73	-4	2	1	1.61040	57.153	1.0
74	4	2	1	1.60080	57.527	1.0
75	-3	3	2	1.59780	57.645	1.0
76	3	3	2	1.58410	58.191	2.0
77	-2	2	4	1.55840	59.246	4.0
78	2	2	4	1.54150	59.961	4.0

### **Structure**

No.	Name	Elem.	X	Y	Z	Biso	sof	Wyck.
1	O1	O	0.19000	0.26000	0.47000	0.5000	1.0000	4e
2	O2	O	0.25000	0.04000	0.03000	0.5000	1.0000	4e
3	O3	O	0.02500	0.21000	0.23500	0.5000	1.0000	4e
4	O4	O	0.47500	0.29000	0.26500	0.5000	1.0000	4e
5	O5	O	0.72000	0.47500	0.22000	0.5000	1.0000	4e
6	O6	O	0.28000	0.52500	0.28000	0.5000	1.0000	4e
7	W1	W	0.03400	0.46700	0.28100	0.5000	1.0000	4e
8	W2	W	0.53300	0.02600	0.28500	0.5000	1.0000	4e

## **Stick Pattern**



### **A.2 – Ficha cristalográfica: Ortorrômbica hidratada ( $\alpha$ -WO<sub>3</sub>·0,33H<sub>2</sub>O)**

#### **Name and formula**

Reference code:	01-072-0199
ICSD name:	Tungsten Oxide Hydrate
Empirical formula:	H <sub>0.66</sub> O <sub>3.33</sub> W
Chemical formula:	WO <sub>3</sub> ( H <sub>2</sub> O ) <sub>0.33</sub>

#### **Crystallographic parameters**

Crystal system:	Orthorhombic
Space group:	Fmm2
Space group number:	42
a (Å):	7.3590
b (Å):	12.5130
c (Å):	7.7040
Alpha (°):	90.0000
Beta (°):	90.0000
Gamma (°):	90.0000
Calculated density (g/cm <sup>3</sup> ):	6.68
Volume of cell (10 <sup>6</sup> pm <sup>3</sup> ):	709.41
Z:	12.00
RIR:	6.13

### **Subfiles and Quality**

Subfiles: Inorganic  
Corrosion  
Modelled additional pattern  
Quality: Calculated (C)

### **Comments**

Additional pattern: See PDF 35-270.  
ICSD collection code: 015514

### **References**

Primary reference: *Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)*  
Structure: Gerand, B., Nowogrocki, G., Figlarz, M., *J. Solid State Chem.*, **38**, 312, (1981)

### **Peak list**

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	0	2	0	6.25650	14.144	38.9
2	1	1	1	4.89696	18.101	82.2
3	0	0	2	3.85200	23.071	76.4
4	2	0	0	3.67950	24.168	7.6
5	1	3	1	3.28276	27.142	44.2
6	2	2	0	3.17166	28.112	100.0
7	0	4	0	3.12825	28.510	47.6
8	2	0	2	2.66069	33.657	10.5
9	2	2	2	2.44848	36.674	48.5
10	0	4	2	2.42834	36.989	23.1
11	2	4	0	2.38034	37.763	10.6
12	3	1	1	2.29763	39.177	4.4
13	1	5	1	2.26466	39.771	4.2
14	1	3	3	2.09618	43.120	5.2
15	0	6	0	2.08550	43.352	1.8
16	3	3	1	2.03904	44.392	7.2
17	2	4	2	2.02675	44.676	5.9
18	0	0	4	1.92600	47.150	6.9
19	0	2	4	1.84075	49.476	15.3
20	0	6	2	1.83396	49.672	9.8
21	2	6	0	1.81434	50.246	16.1
22	4	2	0	1.76502	51.752	1.4
23	3	1	3	1.75624	52.030	2.9
24	1	5	3	1.74138	52.508	3.0
25	3	5	1	1.70637	53.670	7.1
26	1	7	1	1.69452	54.076	3.1
27	4	0	2	1.66012	55.291	6.9
28	2	2	4	1.64624	55.798	12.4
29	2	6	2	1.64138	55.978	20.0
30	3	3	3	1.63232	56.316	3.0
31	4	2	2	1.60460	57.378	3.7
32	4	4	0	1.58583	58.122	9.4
33	0	8	0	1.56412	59.008	4.3
34	2	4	4	1.49800	61.891	6.5
35	4	4	2	1.46642	63.376	8.6
36	0	8	2	1.44921	64.218	4.3
37	3	5	3	1.44715	64.320	2.4

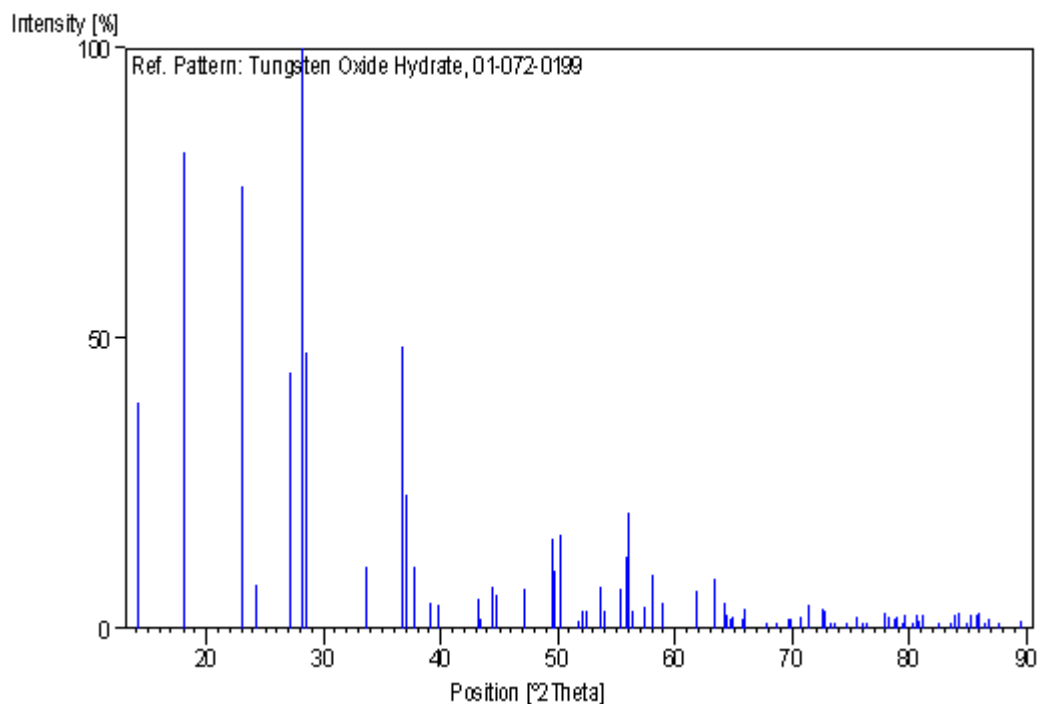
38	2	8	0	1.43881	64.738	1.7
39	5	1	1	1.43610	64.876	2.1
40	3	7	1	1.41992	65.707	1.5
41	1	3	5	1.41824	65.795	1.5
42	0	6	4	1.41492	65.969	3.4
43	4	6	0	1.37964	67.881	0.3
44	5	3	1	1.36594	68.657	1.0
45	2	8	2	1.34839	69.678	1.6
46	1	9	1	1.34518	69.869	1.7
47	4	0	4	1.33035	70.763	2.0
48	2	6	4	1.32064	71.363	4.1
49	4	2	4	1.30125	72.594	3.5
50	4	6	2	1.29885	72.749	3.0
51	1	5	5	1.29169	73.218	1.0
52	0	0	6	1.28400	73.729	0.3
53	5	1	3	1.27035	74.655	0.8
54	0	2	6	1.25779	75.530	2.1
55	5	5	1	1.25181	75.955	0.6
56	3	3	5	1.24525	76.427	0.6
57	4	4	4	1.22424	77.983	2.8
58	5	3	3	1.22100	78.230	2.0
59	0	8	4	1.21417	78.755	1.5
60	2	0	6	1.21231	78.899	1.9
61	1	9	3	1.20611	79.385	0.8
62	6	2	0	1.20359	79.584	2.4
63	3	9	1	1.19492	80.278	0.5
64	4	8	0	1.19166	80.543	2.3
65	2	2	6	1.19017	80.664	1.4
66	0	4	6	1.18783	80.856	1.3
67	2	10	0	1.18467	81.117	2.2
68	6	0	2	1.16869	82.465	0.2
69	3	5	5	1.15696	83.487	0.5
70	2	8	4	1.15302	83.837	2.2
71	6	2	2	1.14882	84.214	2.7
72	6	4	0	1.14187	84.845	0.2
73	4	8	2	1.13843	85.162	2.5
74	2	10	2	1.13233	85.731	2.5
75	2	4	6	1.13039	85.914	2.6
76	5	7	1	1.12407	86.515	0.5
77	4	6	4	1.12158	86.755	1.7
78	1	11	1	1.11241	87.650	0.4
79	6	4	2	1.09478	89.435	0.8
80	0	6	6	1.09339	89.579	1.2

### **Structure**

No.	Name	Elem.	X	Y	Z	Biso	sof	Wyck.
1	O1	O	0.00000	0.00000	0.76000	6.0000	1.0000	4a
2	O2	O	0.00000	0.00000	0.27000	6.0000	1.0000	4a
3	O3	O	0.25000	0.25000	0.31000	6.0000	1.0000	8b
4	O4	O	0.17000	0.11000	0.07000	6.0000	1.0000	16e
5	O5	O	0.00000	0.29000	0.10000	6.0000	1.0000	8c
6	W1	W	0.00000	0.00000	0.00000	1.3000	1.0000	4a
7	W2	W	0.25000	0.25000	0.06000	2.3000	1.0000	8b



## **Stick Pattern**



### **A.3 – Ficha cristalográfica: Hexagonal (*h*-WO<sub>3</sub>)**

#### **Name and formula**

Reference code:	01-075-2187
ICSD name:	Tungsten Oxide
Empirical formula:	O <sub>3</sub> W
Chemical formula:	WO <sub>3</sub>

#### **Crystallographic parameters**

Crystal system:	Hexagonal
Space group:	P6/mmm
Space group number:	191
a (Å):	7.2980
b (Å):	7.2980
c (Å):	3.8990
Alpha (°):	90.0000
Beta (°):	90.0000
Gamma (°):	120.0000

Calculated density (g/cm <sup>3</sup> ):	6.42
Measured density (g/cm <sup>3</sup> ):	6.36
Volume of cell (10 <sup>6</sup> pm <sup>3</sup> ):	179.84
Z:	3.00

RIR:	8.33
------	------

### **Subfiles and Quality**

Subfiles: Inorganic  
Alloy, metal or intermetallic  
Corrosion  
Modelled additional pattern  
Quality: Calculated (C)

### **Comments**

Additional pattern: See PDF 33-1387.  
ICSD collection code: 032001

### **References**

Primary reference: *Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)*  
Structure: Gerand, B., Nowogrocki, G., Guenot, J., Figlarz, M., *J. Solid State Chem.*, **29**, 429, (1979)

### **Peak list**

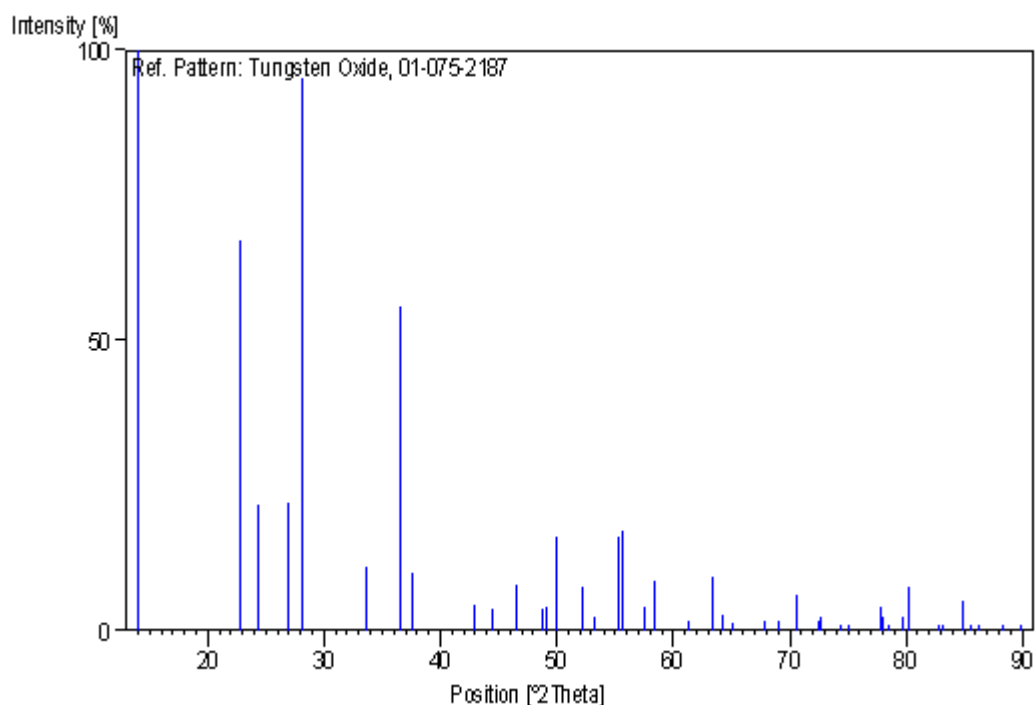
No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	1	0	0	6.32025	14.001	100.0
2	0	0	1	3.89900	22.789	67.4
3	1	1	0	3.64900	24.374	21.6
4	1	0	1	3.31836	26.845	22.0
5	2	0	0	3.16013	28.217	95.2
6	1	1	1	2.66423	33.611	11.0
7	2	0	1	2.45502	36.573	55.9
8	2	1	0	2.38883	37.623	10.0
9	3	0	0	2.10675	42.893	4.3
10	2	1	1	2.03692	44.441	3.8
11	0	0	2	1.94950	46.548	7.7
12	1	0	2	1.86289	48.849	3.7
13	3	0	1	1.85348	49.114	4.0
14	2	2	0	1.82450	49.947	16.2
15	3	1	0	1.75292	52.136	7.6
16	1	1	2	1.71949	53.229	2.5
17	2	0	2	1.65918	55.325	16.0
18	2	2	1	1.65252	55.568	17.3
19	3	1	1	1.59878	57.607	4.0
20	4	0	0	1.58006	58.355	8.4
21	2	1	2	1.51038	61.328	1.6
22	4	0	1	1.46439	63.474	9.3
23	3	2	0	1.44997	64.180	2.7
24	3	0	2	1.43087	65.142	1.2
25	4	1	0	1.37919	67.906	1.8
26	3	2	1	1.35903	69.055	1.5
27	2	2	2	1.33212	70.655	6.1
28	3	1	2	1.30348	72.450	1.5
29	4	1	1	1.30024	72.659	2.4
30	1	0	3	1.27303	74.471	0.4
31	5	0	0	1.26405	75.091	0.1
32	4	0	2	1.22751	77.736	4.0
33	1	1	3	1.22433	77.976	2.4
34	3	3	0	1.21633	78.588	0.2
35	5	0	1	1.20198	79.712	2.4
36	4	2	0	1.19442	80.319	7.5

37	3	2	2	1.16345	82.918	0.7
38	3	3	1	1.16114	83.119	0.5
39	4	2	1	1.14203	84.831	5.1
40	5	1	0	1.13515	85.467	0.9
41	4	1	2	1.12592	86.338	0.5
42	3	0	3	1.10612	88.277	0.2
43	5	1	1	1.08990	89.944	0.6

### **Structure**

No.	Name	Elem.	X	Y	Z	Biso	sof	Wyck.
1	O1	O	0.21200	0.42400	0.00000	5.2000	1.0000	6l
2	O2	O	0.50000	0.00000	0.50000	6.3000	1.0000	3g
3	W1	W	0.50000	0.00000	0.00000	0.5000	1.0000	3f

### **Stick Pattern**



## **A.4 – Ficha cristalográfica: Ácido túngstico ( $\text{H}_2\text{WO}_4$ )**

### **Name and formula**

Reference code:	01-084-0886
Mineral name:	Tungstite
ICSD name:	Tungsten Oxide Hydrate
Empirical formula:	$\text{H}_2\text{O}_4\text{W}$
Chemical formula:	$\text{WO}_3\text{H}_2\text{O}$

### **Crystallographic parameters**

Crystal system: Orthorhombic  
Space group: Pmnb  
Space group number: 62

a (Å): 5.2490  
b (Å): 10.7110  
c (Å): 5.1330  
Alpha (°): 90.0000  
Beta (°): 90.0000  
Gamma (°): 90.0000

Calculated density (g/cm<sup>3</sup>): 5.75  
Volume of cell (10<sup>6</sup> pm<sup>3</sup>): 288.59  
Z: 4.00

RIR: 12.81

### **Subfiles and Quality**

Subfiles: Inorganic  
Mineral  
Corrosion  
Modelled additional pattern  
Quality: Calculated (C)

### **Comments**

Sample source: Specimen from Kootenay Belle mine, Salmo, British Columbia.  
Additional pattern: See PDF 43-679.  
ICSD collection code: 201806

### **References**

Primary reference: *Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)*  
Structure: Szymanski, J.T., Roberts, A.C., *Can. Mineral.*, **22**, 681, (1984)

### **Peak list**

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	0	2	0	5.35550	16.539	62.7
2	0	1	1	4.62891	19.158	2.7
3	1	2	0	3.74869	23.716	6.6
4	1	1	1	3.47177	25.638	100.0
5	1	2	1	3.02732	29.482	0.1
6	0	3	1	2.93103	30.474	6.4
7	0	4	0	2.67775	33.437	6.4
8	2	0	0	2.62450	34.136	10.8
9	0	0	2	2.56650	34.932	10.0
10	1	3	1	2.55908	35.036	19.0
11	0	1	2	2.49585	35.954	0.1
12	1	4	0	2.38529	37.681	5.0
13	2	2	0	2.35672	38.156	5.2
14	0	2	2	2.31446	38.880	6.1
15	2	1	1	2.28307	39.437	0.9
16	1	1	2	2.25402	39.966	0.4
17	1	4	1	2.16314	41.722	0.1

18	2	2	1	2.14177	42.158	0.2
19	1	2	2	2.11773	42.660	2.5
20	0	3	2	2.08395	43.386	0.1
21	0	5	1	1.97694	45.865	2.9
22	2	3	1	1.95522	46.404	3.8
23	1	3	2	1.93688	46.869	0.1
24	2	4	0	1.87434	48.532	1.9
25	1	5	1	1.85008	49.210	5.0
26	2	0	2	1.83495	49.643	9.8
27	2	1	2	1.80860	50.416	0.1
28	0	6	0	1.78517	51.126	0.6
29	1	4	2	1.74721	52.319	3.4
30	2	2	2	1.73589	52.687	9.4
31	1	6	0	1.69010	54.229	2.0
32	0	6	1	1.68611	54.368	1.1
33	3	2	0	1.66316	55.182	0.6
34	3	1	1	1.63665	56.154	9.2
35	2	3	2	1.63203	56.327	5.0
36	1	1	3	1.60831	57.234	7.3
37	1	6	1	1.60532	57.350	3.9
38	2	5	1	1.57908	58.394	2.7
39	1	2	3	1.55653	59.324	0.1
40	0	3	3	1.54297	59.898	0.7
41	2	4	2	1.51366	61.181	3.1
42	3	3	1	1.50235	61.692	2.8
43	1	3	3	1.48034	62.712	3.1
44	2	6	0	1.47607	62.914	1.8
45	0	7	1	1.46638	63.378	1.3
46	3	4	0	1.46471	63.459	1.3
47	0	4	3	1.44180	64.588	0.1
48	3	1	2	1.43269	65.049	0.1
49	2	1	3	1.42065	65.669	0.2
50	1	7	1	1.41153	66.148	1.8
51	3	4	1	1.40849	66.309	1.0
52	3	2	2	1.39572	66.995	0.6
53	2	2	3	1.38458	67.606	0.1
54	0	5	3	1.33691	70.365	0.7
55	2	3	3	1.33013	70.777	0.8
56	4	0	0	1.31225	71.890	1.6
57	3	5	1	1.31022	72.019	1.4
58	1	8	0	1.29734	72.848	0.6
59	1	5	3	1.29555	72.965	0.9
60	0	0	4	1.28325	73.779	0.9
61	2	7	1	1.28012	73.989	1.9
62	4	2	0	1.27455	74.367	1.6
63	3	4	2	1.27212	74.533	1.4
64	4	1	1	1.26250	75.199	0.1
65	3	6	0	1.24956	76.116	0.7
66	0	2	4	1.24793	76.233	1.3
67	1	1	4	1.23818	76.943	0.1
68	0	6	3	1.23525	77.159	0.1
69	3	0	3	1.22330	78.055	0.1
70	3	1	3	1.21540	78.660	2.5
71	1	6	3	1.20240	79.678	0.1
72	3	5	2	1.19769	80.055	0.6
73	2	5	3	1.19126	80.575	0.9
74	4	4	0	1.17836	81.643	0.6
75	2	7	2	1.17517	81.912	0.3
76	4	0	2	1.16838	82.491	1.1
77	3	3	3	1.15726	83.460	2.0

78	2	0	4	1.15282	83.855	0.9
79	2	1	4	1.14620	84.450	0.1
80	4	2	2	1.14153	84.877	1.3
81	1	4	4	1.13009	85.942	0.6
82	2	2	4	1.12701	86.234	1.6
83	3	7	1	1.12348	86.572	1.1
84	1	7	3	1.11457	87.437	0.1
85	4	3	2	1.11044	87.846	0.1
86	0	5	4	1.10085	88.811	0.1
87	2	3	4	1.09705	89.200	0.1
88	4	5	1	1.09331	89.588	0.7

## Structure

No.	Name	Elem.	X	Y	Z	Biso	sof	Wyck.
1	H1	H	0.02200	0.25000	0.55500	2.6056	1.0000	4c
2	H2	H	0.02100	0.25000	0.30000	2.6056	1.0000	4c
3	O1	O	0.27300	0.00500	0.25100	0.5000	1.0000	8d
4	O2	O	0.43400	0.25000	0.56400	0.5000	1.0000	4c
5	O3	O	0.06400	0.25000	0.42500	0.5000	1.0000	4c
6	W1	W	0.27910	0.25000	0.50370	0.5000	1.0000	4c

## B – Rácios RGB calculados para os controlos negativos

### B.1 Microplaca de 96 poços

Tabela 0.1 Rácios RGB calculados para os controlos negativos do ensaio colorimétrico em solução.

Amostra	NC1	NC2	NC3	NS1	NS2	NS3	PT1	PT2	PT3
<i>E. coli</i>	0,83	0,90	0,98	0,87	0,97	0,99	0,85	0,96	0,88
Tampão	0,84	0,94	0,99	0,86	0,96	0,99	0,92	0,96	0,90
Branco	0,93	0,90	0,99	0,87	0,96	0,98	0,81	0,95	0,92

### B.2 Sensor de papel com todas as amostras de WO<sub>3</sub> NPs

- Papel de fotocópia

Tabela 0.2 Rácios RGB calculados para os controlos negativos do ensaio colorimétrico em papel de fotocópia.

Amostra	NC1	NC2	NC3	NS1	NS2	NS3	PT1	PT2	PT3
<i>E. coli</i>	0,98	0,97	0,98	0,93	0,98	0,98	0,95	0,97	0,95
Tampão	0,97	0,99	0,99	0,95	0,96	0,99	0,96	0,99	0,97
Branco	0,97	0,98	0,99	0,96	0,97	0,99	0,96	0,99	0,97

- Papel Whatman

Tabela 0.3 Rácios RGB calculados para os controlos negativos do ensaio colorimétrico em papel Whatman.

Amostra	NC1	NC2	NC3	NS1	NS2	NS3	PT1	PT2	PT3
<i>E. coli</i>	0,91	0,97	0,97	0,90	0,97	0,97	0,90	0,92	0,90
Tampão	0,91	0,96	0,97	0,87	0,95	0,96	0,90	0,91	0,90
Branco	0,90	0,96	0,96	0,87	0,96	0,97	0,88	0,97	0,89

### B.3 Otimização do sensor de papel de fotocópia (poços 7 x 7 mm)

Tabela 0.4 Rácios RGB calculados para os controlos negativos do ensaio colorimétrico de optimização em papel de fotocópia com poços 7 x 7 mm.

Amostra	WO <sub>3</sub> NPs 5 g/L	WO <sub>3</sub> NPs 10 g/L	WO <sub>3</sub> NPs 15 g/L	WO <sub>3</sub> NPs 20 g/L	WO <sub>3</sub> NPs 25 g/L	WO <sub>3</sub> NPs 30 g/L
<i>E. coli</i>	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
Branco	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98

### B.4 Otimização do sensor de papel de fotocópia (poços 3,84 x 3,84 mm)

Tabela 0.5 Rácios RGB calculados para os controlos negativos do ensaio colorimétrico de optimização em papel de fotocópia com poços 3,84 x 3,84 mm.

Amostra	WO <sub>3</sub> NPs 5 g/L	WO <sub>3</sub> NPs 10 g/L	WO <sub>3</sub> NPs 15 g/L	WO <sub>3</sub> NPs 20 g/L	WO <sub>3</sub> NPs 25 g/L	WO <sub>3</sub> NPs 30 g/L
<i>E. coli</i>	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98
Branco	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98

## C – Ensaio colorimétricos em diferentes substratos de papel

### C.1 Vários tipos de papel de cromatografia

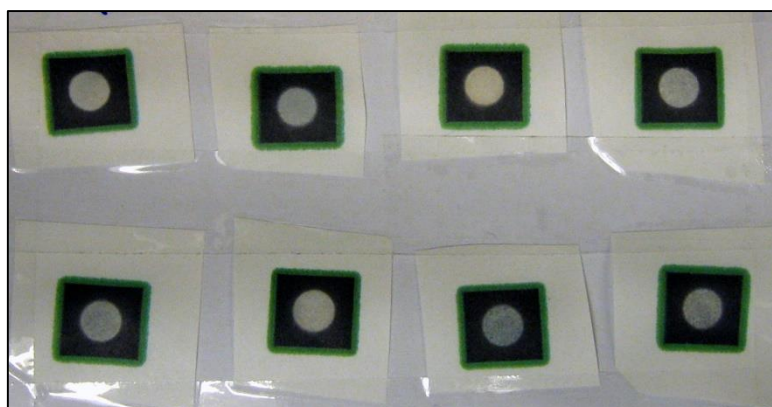


Figura 0.1 Resultados colorimétricos em vários tipos de papel de cromatografia. Cada poço foi impregnado com uma dispersão de 10 g/L *h*-WO<sub>3</sub> NPs e utilizou-se a bactéria *G. sulfurreducens* na fase exponencial-tardia ( $Abs_{600\text{ nm}} = 0,5$ , correspondente a 0,33 g/L).

## C.2 Papel coreano

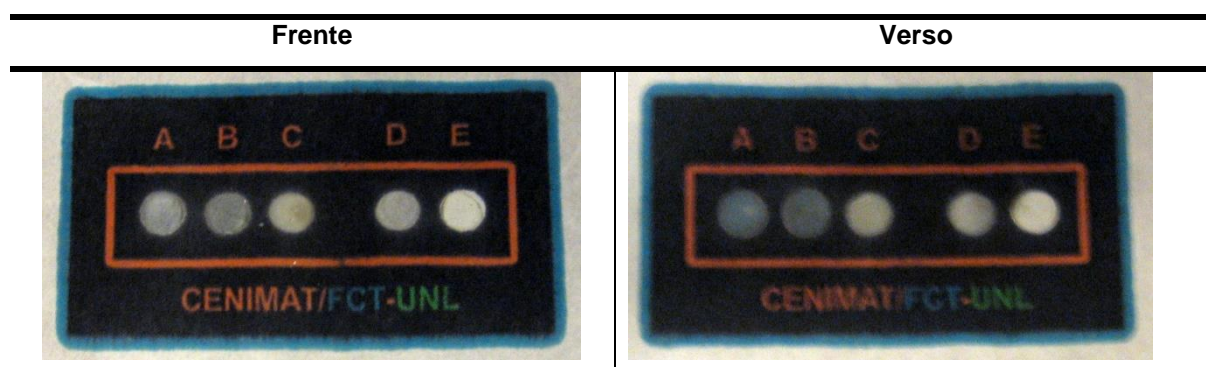


Figura 0.2 Resultados colorimétricos na frente e verso de papel coreano. A – *G. sulfurreducens* na fase exponencial ( $Abs_{600\text{ nm}} = 0,3$ , correspondente a 0,20 g/L); B – *G. sulfurreducens* na fase exponencial-tardia ( $Abs_{600\text{ nm}} = 0,5$ , correspondente a 0,33 g/L); C – *E. coli*; D – tampão; E – branco.

## C.3 Papel de celulose bacteriana

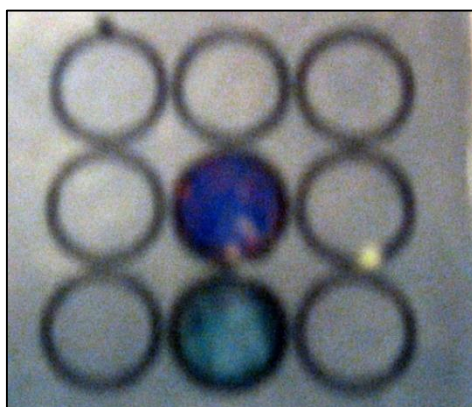


Figura 0.3 Resultados colorimétricos em papel de celulose bacteriana. O poço a roxo refere-se a uma solução aquosa de corante alimentar que foi usado para verificar que as barreiras hidrofóbicas foram formadas com sucesso. O poço azul foi impregnado com uma dispersão de  $h\text{-WO}_3$  NPs a 10 g/L e utilizou-se a bactéria *G. sulfurreducens* na fase exponencial-tardia ( $Abs_{600\text{ nm}} = 0,5$ , correspondente a 0,33 g/L).

## D – Análise ANOVA

### D.1 Sensor colorimétrico com $h\text{-WO}_3$ NPs 10 g/L

Tabela 0.6 – Teste de múltipla comparação de Tukey para as  $h\text{-WO}_3$  NPs 10 g/L.

	Mean Diff.	q	Significance	Summary	99.9 % CI of diff
<b>Gs vs. <i>E. coli</i></b>	0.3728	13.98	Yes	***	0.1656 to 0.5799
<b>Gs vs. Branco</b>	0.3771	14.14	Yes	***	0.1700 to 0.5843

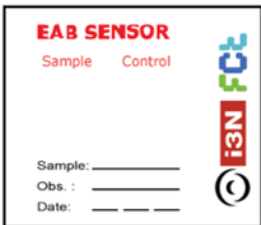


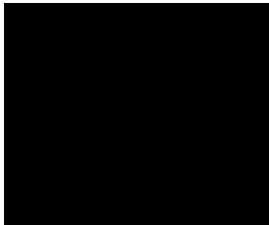


## D.2 Sensor colorimétrico com $h\text{-WO}_3$ NPs 15 g/L

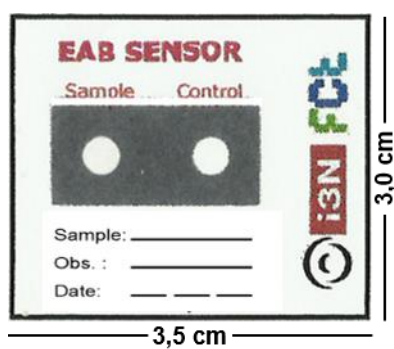
Tabela 0.7 – Teste de múltipla comparação de *Tukey* para as  $h\text{-WO}_3$  NPs 15 g/L.

	Mean Diff.	q	Significance	Summary	99.9 % CI of diff
<b>Gs vs. <i>E. coli</i></b>	0.3408	211.9	Yes	***	0.3167 to 0.3649
<b>Gs vs. Branco</b>	0.3439	213.6	Yes	***	0.3200 to 0.3715

## E – Protótipo do sensor colorimétrico de papel desenvolvido

Frente	Poços	Verso
	<p>Antes da difusão</p>  <p>Depois da difusão</p> 	

### Sensor final



**Nota:** Este documento foi impresso no papel utilizado como substrato, no sensor colorimétrico desenvolvido neste trabalho, para a detecção de bactérias eletroquimicamente ativas.

